

157a
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VALIDACION MICROBIOLÓGICA DEL PROCESO
DE LLENADO ASEPTICO DE POLVOS ESTERILES,
MEDIANTE EL LLENADO SIMULADO CON
MEDIOS DE CULTIVO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L Ó G O
P R E S E N T A I
RAYMUNDO ROJAS RUSSELL



MEXICO, D. F.



1994

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron EL pasante(s) RAYMUNDO ROJAS RUSSELL

con número de cuenta 7835810-8 con el Título:

VALIDACION MICROBIOLOGICA DEL PROCESO DE LLENADO ASEPTICO DE POLVOS ESTERILES, MEDIANTE EL LLENADO SIMULADO CON MEDIOS DE CULTIVO

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
QFB	JUANA ALEJANDRA	ZANABRIA SALCEDO	
Director de Tesis DRA.	MARIA CRISTINA	PEREZ-AMADOR BARRON	
M. EN C.	ALICIA	BRECHU FRANCO	
BIOL.	JOSEFINA	HERREBA SANTOYO	
Suplente BIOL.	MARCO ANTONIO	MONTES FLORES	
Suplente			

A mi Madre

INDICE

	Pag.
Indice	1
Resumen	3
1.0 INTRODUCCION:	4
1.1 Objetivo	4
1.2 Antecedentes	4
1.3 Procesamiento de Materiales y Materias Primas	9
1.4 Sistema de Limpieza y Sanitización	10
1.5 Evaluación del Ambiente de Fabricación	10
1.6 Procedimiento de Operación del llenado	11
1.7 Pruebas Microbiológicas de las unidades llenadas	12
1.8 Criterio de Evaluación	12
2.0 MATERIALES:	14
2.1 Equipos	14
2.2 Materiales	14
2.3 Medios de Cultivo	14
2.4 Reactivos	15
2.5 Cepas de Microorganismos	15
3.0 METODO:	17
3.1 Antes de preparar el Llenado Simulado	17
3.1.1 Sistema de Agua	18
3.1.2 Sistema de Aire	18
3.1.3 Procesado del Tapón	18
3.1.4 Procesado de Frasco	20
3.1.5 Sistema de Sanitización	22
3.1.6 Arranque de areas esteriles	23
3.1.7 Otros Estudios	23
3.2 Preparación del llenado simulado con medio de cultivo	25
3.2.1 Evaluación y aprobación del ambiente del Area de Fabricación	25
3.2.2 Preparación del polvo	28
3.2.3 Preparación del medio de cultivo	29
3.2.4 Preparación del área	31
3.3 Procedimiento del llenado aséptico con medio de cultivo	34

3.3.1	Procedimiento de operación	34
3.3.2	Monitoreo del ambiente de fabricación	35
3.4	Pruebas Microbiológicas	35
3.4.1	Prueba de Bacteriostasis y Fungistasis	36
3.4.2	Esterilidad de materiales y Pruebas especiales	37
3.4.3	Esterilidad de frascos llenados	37
3.4.4	Unidades contaminadas	38
4.0	RESULTADOS:	40
4.1	Sistemas y equipos relacionados	40
4.2	Evaluación Ambiental (antes del llenado)	41
4.3	Polvo de llenado	43
4.4	Medio de cultivo	44
4.5	Registros del Area	45
4.6	Monitoreo ambiental durante el llenado	45
4.7.1	Pruebas Microbiológicas	45
4.7.2	Esterilidad de materiales	46
4.7.3	Esterilidad de frascos	46
4.7.4	Unidades contaminadas	48
5.0	CONCLUSIONES.	50
6.0	BIBLIOGRAFIA.	53

RESUMEN.

Debido a la importancia que tiene el llenado de polvos estériles en la fabricación de inyectables, la evaluación de su calidad microbiológica y los nuevos requerimientos para la aprobación de este tipo de procesos, el presente estudio evalúa el llenado aséptico, en cuanto a protegerlo de eventuales microorganismos contaminantes, en un área aséptica ("estéril") con dos llenadoras de polvos estériles penicilínicos.

El método consiste en efectuar pruebas de llenado simulado con un polvo inerte y medio de cultivo líquido, taponando e incubando para que se manifestaran las unidades contaminadas.

Antes de las pruebas se calificaron los equipos y sistemas involucrados, como son los procesos de lavado y esterilización de frasco y tapón, sistemas de limpieza y sanitización de equipos y área aséptica, evaluación de sistemas de aire y agua, y la evaluación de los insumos propios de la prueba, como son el polvo de llenado y del medio de cultivo.

Durante el llenado se efectuaron monitoreos ambientales. Después de la prueba, además de la cuantificación de los frascos contaminados, se evaluó la viabilidad de los microorganismos en los frascos llenados. Se determinaron los siguientes límites: un mínimo de 3000 frascos llenados y un límite máximo de contaminación de 0.1% por prueba y mínimo 3 pruebas satisfactorias.

De las dos llenadoras en el área evaluada una de ellas cumplió con los límites.

El Área evaluada es capaz de llenar polvos inyectables de una calidad microbiológica aceptable.

Los microorganismos contaminantes fueron claramente relacionados con el personal.

Los porcentajes de contaminaciones no concuerdan con los porcentajes de positivos en la prueba de esterilidad de los productos llenados normalmente.

1.0 INTRODUCCION:

1.1 Objetivo:

El objetivo de la validación es confirmar la aceptabilidad del procedimiento del llenado aséptico del polvo, al protegerlo de eventuales microorganismos contaminantes, también es evaluar los procedimientos de operación, el equipo y/o material y el medio ambiente asociado al llenado, mostrando que el nivel de contaminación de las unidades llenadas se encuentra por debajo del límite establecido para tal fin (5.1.03, 08, 16, 17, 21, 22, 23, 24).

1.2 Antecedentes:

Dentro de la industria alimenticia y farmacéutica, existen áreas asépticas, donde se realizan procesos de fabricación, muestreo y análisis. Estas áreas deben reunir una serie de características ambientales y de prácticas de manufactura, para cumplir con el objetivo de hacer procesos microbiológicamente aceptables. El llenado y el procesamiento de polvos y líquidos estériles casi siempre representa el área más diversa y compleja de la producción farmacéutica, y probablemente, el procesamiento de polvos estériles no liofilizables y sin esterilización terminal es el más difícil de desafiar microbiológicamente. Se requiere de una gran cantidad de equipos y procesos para cumplir con los requerimientos microbiológicos. Estos incluyen: diseño del área, limpieza y sanitización del área, lavado y esterilización / despirogenización de contenedores y tapones, equipo de llenado y taponado, sistema de aire (flujo laminar), manejo del personal, etc. En el llenado de polvos y soluciones o suspensiones inyectables, la mayoría de las organizaciones de control sanitario, reconocen que los procesos de llenado aséptico no pueden excluir a todos

los microorganismos del medio ambiente, por esta razón, siempre existe la posibilidad de que el personal, el equipo, el medio ambiente o las materias primas contribuyan con microorganismos viables que entren al producto expuesto durante el proceso de fabricación, sin embargo, la posibilidad de que el producto sea contaminado debe mantenerse en niveles muy bajos (5.1.23).

Debido a que en el presente estudio los productos que se llenan en las áreas estériles son antibióticos y aún que la prueba de esterilidad que se realiza a los productos que se llenan en estas áreas se efectúa agregando penicilinas para evitar el efecto de los antibióticos sobre el crecimiento de los microorganismos, es indispensable evaluar el efecto que tienen sobre el crecimiento de los posibles microorganismos contaminantes. Lo anterior unido a que las cantidades de muestra para la prueba de esterilidad, son representativas de todo el día de llenado, pero no en cantidad suficiente para asegurar la esterilidad de todas las piezas llenadas con un buen nivel de confianza, hace indispensable la validación microbiológica del Llenado aséptico de polvos estériles.

Para los procesos de fabricación de productos farmacéuticos, como para sus procesos de validación y control, existen una gran cantidad de recomendaciones (5.1.01, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 11, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25). Los lineamientos generales de una validación se encuentran bien definidos en los documentos, tanto oficiales, como de los laboratorios que fabrican parenterales o de las asociaciones farmacéuticas, sin embargo la institución que marca los lineamientos generales es la (FDA) "Food & Drug Administration" (5.1.07, 10, 12, 16). FDA define los procesos de validación como "...un programa documentado que provee un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico producirá consistentemente un

producto de acuerdo a las especificaciones predeterminadas y los atributos de calidad" (5.1.07, 12). Esta definición es seguida por todas las demás asociaciones farmacéuticas, especialmente las asociaciones internacionales.

En México se tiene muy poca información acerca de este tipo de validaciones, no por que no se hayan hecho, sino al parecer, por la falta de medios de información, o tal vez por resultados insatisfactorios en las validaciones, teniendo para la aprobación del proceso únicamente la prueba de esterilidad. Sin embargo la prueba de esterilidad tiene serios problemas de nivel de confianza, de acuerdo con el método de muestreo para la prueba de la USP XXII, un total de 20 frascos con una dosis de más de 300mg de polvo, muestreados al azar de un llenado continuo de no mas de 24 horas, de una sola llenadora, son suficientes para la prueba de esterilidad, por ejemplo: Supongamos una fábrica con un área aséptica de llenado y una llenadora de polvo estéril, que llena 10,000 frascos por día y que el 1% de los frascos llenados estuviese contaminado, es decir, 100 frascos por día. Si se tomara la muestra para la prueba de esterilidad al azar por día, la probabilidad de tomar un frasco contaminado ($100/10,000$) es del 1% si se tomara un frasco, al tomarse 20 la probabilidad suma un 20% y por tanto de detectarlo en la prueba de esterilidad. Si se trabajaran 100 días y a cada uno se le efectuara la prueba de esterilidad, aproximadamente 20 de estas pruebas deberían resultar positivas, los otras 80 negativas (producto estéril) y serian liberados para su venta. Supongamos que a los 20 días que resultaron positivos, se les efectuara una segunda prueba con el doble de muestra (40 frascos), la probabilidad de detectarlo sería del 40%. Es decir, el 40% de los 20 días, aproximadamente 8 días deberían dar resultados positivos y por tanto ser rechazados para su distribución (80,000 frascos). Los 12 días de llenado restantes

serian liberados y que sumados a los 80 primeros suman 92 días con 920,000 frascos de los cuales 9,200 frascos estarían contaminados (5.1.17).

Hay dos diferentes tipos de validación de acuerdo a la forma de planear obtener los resultados (5.1.23):

I) Proceso de validación retrospectiva: que consiste en el procesamiento de los resultados de los análisis, "data histórica", que tienen que ver con el proceso a validar.

II) Proceso de validación esperado: que consiste en la ejecución experimental de un plan basado en el proceso a validar y que provee formal, documentada y sistemáticamente, evidencia de que un proceso es ejecutado de acuerdo a las especificaciones y procedimientos de producción.

La validación incluye demostrar que a lo largo de toda la línea de llenado y taponado se mantiene la Clase 100. La cuenta de partículas se hace en puntos, a todo lo largo de la línea.

También incluye el muestreo microbiológico del aire y de las superficies. El conteo de partículas comparado con el monitoreo microbiológico, permite correlacionarlos y utilizarlo como sustituto del monitoreo microbiológico.

Dentro del método de validación con medio de cultivo hay muchas variantes, según las características del área, el producto y las facilidades de operación. Básicamente, consiste en llenar las unidades con un volumen apropiado de medio de cultivo líquido estéril y un peso predeterminado de polvo estéril, los viales son tapados, sellados e incubados.

Para el proceso de llenado aséptico, como para su validación microbiológica, se requiere del control, monitoreo, calificación o validación de los siguientes procesos o sistemas:

- a) Procesado de frasco y tapon (5.2.19, 23, 28, 30).
- b) Sistema de limpieza y sanitización del Área (5.2.32, 35).

c) Lavado y esterilización de equipos y materiales (5.2.29)

Para la validación de estos procesos es indispensable evaluar o calificar los siguientes sistemas de:

d) Aire (5.2.09, 11, 24, 31).

e) Agua (5.2.29).

f) Equipos (2.2.14, 15, 16, 17, 18, 23).

Para la validación microbiológica del llenado aséptico mediante la prueba de llenado simulado con medio de cultivo son necesarias las siguientes pruebas microbiológicas (5.1.01, 02, 03, 08, 10, 12, 16, 17, 21, 23):

g) Polvo de llenado inerte: Esterilidad, disolución en el medio de cultivo y la no inhibición del crecimiento de los microorganismos (5.2.04, 25).

h) Medio de cultivo: Esterilidad y promoción de crecimiento de los microorganismos (5.2.05).

i) Al producto final (Polvo + Medio de cultivo, tapado y engargolado) Esterilidad, Bacteriostasis y Fungistasis (5.2.33).

Durante el llenado es necesario efectuar:

j) Monitoreos microbiológicos del ambiente (5.2.03, 09, 24).

k) Muestreo de frasco y tapón para prueba de esterilidad (5.2.33).

Todas las validaciones, calificaciones o evaluaciones de los procesos, sistemas o equipos, incluso la validación integral del llenado, así como los procedimientos, métodos y especificaciones, necesitan un Protocolo o documento donde se especifique el procedimiento y los límites o criterios

cuantitativos de aceptación de resultados.

Para el procedimiento de validación microbiológica se agrega un paso más que en el proceso de fabricación normal, que es el añadir el medio de cultivo, y cambiar el polvo de llenado normal a un polvo inerte.

Únicamente se detectan microorganismos aerobios, por que no hay evidencia de la presencia de anaerobios estrictos. Los períodos y las temperaturas de incubación deben ser los apropiados para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, la bibliografía (5.1.08,17,21,23,) indica 20-25°C para hongos (mohos y levaduras) y 30-35°C para bacterias.

1.3 Procesamiento de Materiales y Materias Primas:

Los materiales propios de un llenado aséptico incluyen los equipos y todos los accesorios de estos, indispensables para la fabricación de los polvos estériles inyectables. Como se menciona antes, cada uno de los procesos que incluyen el proceso integral, en sus partes mas importantes, ha sido validado, en el caso de todas las materias primas y de los materiales, lo más importante es asegurar su limpieza y esterilidad.

1.3.1 Tapón:

El tapón se lava, siliconiza, esteriliza y seca en equipos especialmente diseñados para tal fin. La salida del tapón estéril es en el interior del área estéril, donde se enfría bajo flujo laminar hasta antes de su uso (5.2.17, 18).

1.3.2 Frasco:

El frasco se lava, esteriliza y despirogeniza en equipos

especiales para ello (5.2.16, 18).

1.3.3 Equipo:

Las partes desmontables del equipo de llenado, se desarman, lavan, esterilizan y vuelven a armar. Se desarman dentro del área estéril, se lavan fuera del área, se esterilizan en autoclave y se arma dentro del área sobre el equipo (5.2.10, 11, 12, 14).

1.3.4 Polvo de llenado inerte:

Al polvo a llenar, únicamente se le verifica su esterilidad, disolución y que no afecte el crecimiento de los microorganismos. Se escoge el Polietilenglicol 8000, por ser un polvo inerte, sin reportes de inhibición sobre los microorganismos y recomendado para llenados simulados (5.2.04).

1.3.5 Medio de Cultivo:

Al medio de cultivo ya preparado, se le verifica su esterilidad y su promoción de crecimiento de microorganismos (5.2.05, 07, 25).

1.4 Sistema de limpieza y sanitización:

El objetivo final de la limpieza y sanitización es garantizar la esterilidad del producto, por tanto es indispensable evaluar los sanitizantes, la limpieza y sanitización exhaustiva de los materiales, utensilios, herramientas, equipos, maquinaria y áreas (5.2.01, 10).

1.5 Evaluación del ambiente de fabricación:

En todas las Areas de llenado aséptico se evalúa el ambiente de fabricación física y microbiológicamente. El monitoreo microbiológico del aire, puede ser a base de exposición de placas

con agar soya y micofilico o mediante un muestreador de aire (Biotest), debiendo existir limites de alerta y limites de acción, con el objetivo de tomar medidas preventivas, o acciones correctivas en caso de que el número de unidades formadoras de colonias (ufc) sea mayor de lo normal o permitido, y/o correlacionar las contaminaciones de la prueba de esterilidad con el monitoreo ambiental. Se pueden muestrear las superficies del Area, de los equipos y materiales, mediante placas de contacto o muestreadores de superficies con agar soya y micofilico. Para una validación se evalúa el ambiente de fabricación antes del llenado, mediante pruebas físicas, como conteo de partículas, velocidad del aire, humedad y temperatura, y con el monitoreo microbiológico mediante exposición de placas, muestreo del aire y superficies durante 3 días consecutivos, para aprobar el ambiente del Area de fabricación, y entonces efectuar el llenado simulado. Durante el transcurso del llenado simulado con medio de cultivo, únicamente se hace el monitoreo microbiológico, con el objeto de evaluar las condiciones del Area y correlacionar cualquier contaminación que apareciera en los frascos (5.2.03, 06, 09, 24, 29).

1.6 Procedimiento de Operación del llenado.

El procedimiento debe ser prácticamente el mismo que el procedimiento de fabricación de polvos estériles inyectables. Esto incluye todos los procedimientos que tienen que ver con el ingreso, vestido, lavado de manos y boca, procedimientos de operación, y comportamiento del personal en el Area Estéril, etc.. La dosificación del polvo y el tamaño del frasco, es de acuerdo a las cantidades dosificadas normalmente en el área a validar, y la cantidad de Medio de Cultivo líquido, debe ser lo suficiente para detectar cualquier contaminación. Las

actividades realizadas durante el llenado, deben ser las mismas que se efectúan cotidianamente en los procesos de fabricación (5.2.11, 12, 14, 20, 21, 26).

En el presente trabajo se siguieron básicamente dos procedimientos:

A.) Utilizando caldo soya tripticaseína deshidratado, e irradiado como polvo de llenado y reconstituyendo el medio mediante la inyección del volumen apropiado de agua destilada estéril en el Área aséptica del Laboratorio de Microbiología. Y donde el procedimiento de fabricación es prácticamente el mismo que el utilizado en el Área a probar.

B.) Utilizando Polietilenglicol 8000 irradiado como polvo de llenado inerte, y agregando inmediatamente después el medio de cultivo líquido. En este caso se efectúa un paso más al proceso de fabricación, al agregar el medio de cultivo en la misma Área productiva (5.1.13, 15, 5.2.33).

- 1.7 Pruebas Microbiológicas de las unidades llenadas:
Para la Validación mediante el llenado simulado con medio de cultivo: Una vez hecho el llenado, los frascos con el medio de cultivo y el polvo, se incuban para detectar las contaminaciones e se identifican para saber su procedencia. A otros frascos se les hace la prueba de bacteriostasis y fungistasis (5.18, 19, 5.2.33).
- 1.8 Criterio de Evaluación:
La bibliografía (5.1.10) especifica un límite máximo de contaminación de 0.1 % en procesos de validación microbiológica mediante llenados simulados asépticos, en mínimo 3000 piezas llenadas y con un 95 % de probabilidad de detectar las unidades no estériles. Cuadro 1 (5.1.4, 16, 5.2.33).

**Cuadro 1. Probabilidad de detectar NO estériles mediante
llenado simulado**

x	100	500	1000	1500	2000	3000	5000	10000	15000	20000	30000
0.01	1.0	4.9	9.5	13.9	18.1	25.9	39.3	63.2	77.7	86.5	95.0
0.05	4.9	22.1	39.4	52.8	63.2	77.7	91.8	99.3	>99.9		
0.1	9.5	39.4	63.2	77.7	86.5	95.0	99.3	>99.9			
0.2	18.1	63.2	86.5	95.0	98.2	99.8	>99.9				
0.3	26.0	77.7	95.0	98.9	99.7	>99.9					
0.4	33.0	86.5	98.2	99.8	>99.9						
0.5	39.4	91.8	99.3	>99.9							
0.75	52.5	97.7	>99.9								
1.0	63.4	99.3									
2.0	86.7	>99.9									
3.0	95.2										
4.0	98.3										
5.0	99.4										
10.0	>99.9										

La probabilidad de detectar No estériles en llenados simulados se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$P = 1 - (1 - x)^N$$

Donde P es la probabilidad, x es el rango de contaminación aceptable y N es el número de viales llenados (5.1.24).

2.0 MATERIALES:**2.1 Equipos.**

- 2.1.1 Lavadora, esterilizadora y despirogenizadora de frasco vial: "GILOWY".
- 2.1.2 Procesador de Tapón "ICOS".
- 2.1.3 Llenadoras de polvo Antibiótico:
 - 2.1.3.1 "PERRY" I.
 - 2.1.3.2 "PERRY" II.
- 2.1.4 Campanas de flujo laminar: Antibióticos Penicilínicos: Area I y salida de tapón.
- 2.1.5 Autoclave "FEDEGARI".
- 2.1.6 Engargoladoras.
- 2.1.7 Autoclave "AMSCO".
- 2.1.8 Campana de flujo laminar de Microbiología.
- 2.1.9 Cuartos incubadores I Y II.
- 2.1.10 Bomba Peristáltica dosificadora de líquidos.

2.2 Materiales:

- 2.2.1 Frascos viales de 10, 12 y 25 ml.
- 2.2.2 Tapones de hule gris clorobutilo.
- 2.2.3 Retapas de aluminio.
- 2.2.4 Contenedores de Vidrio autoclaveables de 4-10 litros.
- 2.2.5 Jeringas desechables de 20 ml.
- 2.2.6 Tubos de cultivo de 38 x 200 mm.

2.3 Medios de Cultivo:

- 2.3.1 Caldo soya Tripticaseína.
Contenido por cada 30.0 g de medio deshidratado (1 litro):

Peptona de Caseína	17.0 g
Peptona de Soya	3.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g

-
- | | | |
|---------|--|-------------|
| | Fosfato Dipotásico | 2.5 g |
| | Dextrosa | 2.5 g |
| | pH: | 7.3 +/- 0.2 |
| 2.3.2 | Agar soya tripticaseína. | |
| | Contenido por cada 40.0 g de medio deshidratado (1 litro): | |
| | Peptona de Caseína | 15.0 g |
| | Peptona de Soya | 3.0 g |
| | Cloruro de Sodio | 5.0 g |
| | Agar-agar | 15.0 g |
| | pH: | 7.3 +/- 0.2 |
| 2.3.3 | Repuestos para muestreador centrífugo de aire con agar soya tripticaseína y 1 % de penicilinas concentrada. | |
| 2.3.4 | Repuestos para muestreador centrífugo de aire con agar micofílico (DIFCO). | |
| 2.3.5 | Muestreadores por contacto con agar soya tripticaseína, 1 % de penicilinas concentrada y 0.07 % de lecitina de soya. | |
| 2.3.6 | Muestreadores por contacto con agar micofílico 1 % de penicilinas concentrada y 0.07 % de lecitina de soya. | |
| | Digerido papaínico de soya | 10.0 g |
| | Dextrosa | 10.05 g |
| | Agar | 16.0 g |
| | pH: | 7.0 +/-0.2 |
| 2.4 | <u>Reactivos:</u> | |
| 2.4.1 | Sanitizantes: | |
| 2.4.1.1 | Control. | |
| 2.4.1.2 | Cloruro de Benzalconio. | |
| 2.4.1.3 | Hipoclorito de Sodio. | |
| 2.4.1.4 | Glutardialdehído. | |
| 2.4.2 | Penicilinas concentrada. Mínimo 10,000 UI/ml o 20,000 UL/ml/min. | |
| 2.4.3 | Agua Destilada Estéril. | |

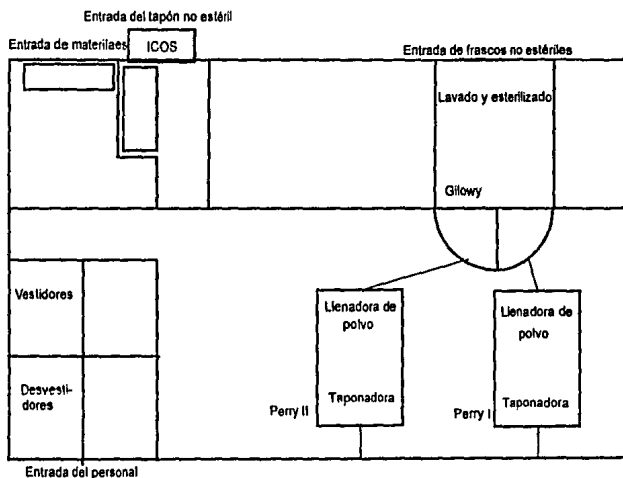
- 2.5 **Cepas de Microorganismos:**
- 2.5.1 **Bacillus subtilis** ATCC 6633.
- 2.5.2 **Candida albicans** ATCC 10231.
- 2.5.3 **Staphylococcus aureus** ATCC 6538-P.
- 2.5.4 **Aspergillus niger** ATCC 16404.
- 2.5.5 **Clostridium sporogenes** ATCC 11437.
- 2.5.6 **Escherichia coli** ATCC 8739.
- 2.5.7 **Staphylococcus epidermidis**.
- 2.5.8 **Staphylococcus sp.**
- 2.5.9 **Bacillus sp.**
- 2.5.10 **Bacteroides vulgatus** ATCC 8432.
- 2.5.11 **Staphylococcus sacharolyticus**.
- 2.5.12 **Staphylococcus simulans**.
- 2.5.13 **Bacillus licheniformis**.
- 2.5.14 **Staphylococcus hominis**.

3.0 METODO:

3.1 Antes de preparar el Llenado Simulado:

El estudio se realizó en un área aséptica (estéril) con dos líneas de llenado, la ubicación de los equipos y distribución del área se muestran en la Figura 1.

Figura 1.



Aunque forman parte de la validación microbiológica del llenado aséptico, no se reportan como resultados del presente trabajo los estudios de validación, calificación o evaluación de los siguientes sistemas o procesos:

3.1.1 Agua:

La calidad del agua es un factor muy importante para garantizar el buen funcionamiento de todos los sistemas y equipos, el sistema se eval a periódicamente desde los pozos, hasta los sitios donde se esta utilizando e inclusive el agua residual, la frecuencia de muestreo para analisis varía dependiendo del sitio de muestreo, los analisis son fisicos, químicos, fisicoquímicos, orgánicos y microbiológicos, este ltimo incluyendo cuenta total de bacterias, coliformes, enterobacterias y en algunos casos identificando los microorganismos. Durante el recorrido del agua se incluyen un gran n mero de puntos intermedios de evaluación.

3.1.2 Aire:

El aire es otro factor muy importante en el llenado aséptico de los polvos estériles ya que su contacto con el producto es inevitable y es el medio de transporte de muchos de los microorganismos. Su evaluación se lleva a cabo periódicamente mediante el conteo de partículas, velocidad del aire, integridad de filtros y pruebas con DOP, en los filtros absolutos del área y de las campanas de flujo laminar, teniéndose límites máximos de partículas, mínimos de velocidad del aire y de la integridad de los filtros, en caso de no cumplir con las especificaciones satisfactoriamente se cambian y eval an inmediatamente. También se controla la presión positiva del área, es decir que el aire salga y no entre por las puertas o esclusas, además de que se hizo una calificación para determinar la correlación entre la presión diferencial y el Flujo Laminar en los Filtros Hepa de las unidades de flujo laminar del Area a validar.

3.1.3 Procesado del Tapón:

Lo más importante del proceso de tapón es garantizar la limpieza y esterilidad del mismo. El proceso se efectúa en la procesadora automática de tapones "ICOS", que lava, esteriliza, siliconiza y seca los tapones. Se efectúa la validación con el objetivo de demostrar que cada una de las operaciones que realiza, son de acuerdo a los requerimientos y especificaciones de la operación, proporcionando tapones siliconizados adecuadamente, libres de partículas, pirógenos, y microorganismos, entre las evaluaciones que se llevaron a cabo a los tapones en la validación están las siguientes pruebas:

- a) Esterilidad
- b) Endotoxina
- c) Partículas
- d) Residuos de Detergente
- e) Contenido de agua

Para la prueba de esterilidad y endotoxina se muestrearon tapones durante 5 días consecutivos.

La validación incluye la calificación termodinámica.

Un ciclo de la procesadora ejecuta las etapas indicadas en el siguiente Cuadro.

Cuadro 2. Etapas de la procesadora de tapón.

Etapas	Características		
	Presión (Bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Enjuague-lavado		60	3
Siliconizado		90	4
Vacio preliminar	Hasta -0.56		

Vacio fraccionado	-0.56-0.49		
Precalentamiento		hasta 119	
Exposición		121.1	25
Secado	Inyección de aire	120	10
Enfriamiento		50	30

Las primeras dos etapas no se incluyen en la calificación termodinámica que se continua haciendo periodicamente mediante el equipo "DIGISTRIP III", se efectuan tres ciclos mínimo con resultados satisfactorios, esto son: La temperatura de exposición de todos los sitios de registro deben ser mayores o iguales a 121.1°C, El gradiente de temperatura máximo de todos los sitios de registro durante la exposición debe ser menor o igual a 1.0°C, todos los sitios de registro deben tener un F₀ mayor o igual a 15 minutos.

3.1.4 Procesado del Frasco:

Lo más importante del proceso de frasco es garantizar la limpieza y esterilidad del mismo. El proceso se efectua en el proccsador automatico de frascos "GILOWY", que lava, esteriliza, despirogeniza y seca los frascos. Se efectua la validación con el objetivo de demostrar que cada una de las operaciones que realiza, son de acuerdo a los requerimientos y especificaciones de la operación, proporcionando frascos libres de partículas, pirógenos y microorganismos, entre las evaluaciones que se llevaron a cabo a los frascos en la validación estan las siguientes pruebas:

a) Esterilidad.

- b) Endotoxina.
- c) Partículas.
- d) Contenido de agua.

Para la prueba de esterilidad y endotoxina se muestrearon frascos durante 5 días consecutivos.

La validación incluye la calificación termodinámica, con el objetivo de determinar si el t nel es capaz de mantener a la temperatura de 300°C por 3 minutos, en los frascos viales introducidos en él y que en los estudios termodinámicos-microbiológicos, es posible alcanzar una reducción de al menos tres logaritmos de una población inicial de endotoxina y alcanzar un valor de Fh arriba de 30 minutos (6 logaritmos de reducción) para una temperatura basal de 250, un valor Z de 46.4°C. Periódicamente se continúa realizando la calificación térmica del t nel para conocer su estado.

El Cuadro siguiente muestra el recorrido del frasco por el túnel:

Cuadro 3. Zonas del t nel de lavado y esterilizado de frasco.

Zonas	Características		
		Poros de filtros (micras)	Temperatura (°C)
Entrada			
Lavado 1	Agua potable	0.45	
Lavado 2	Agua desmineralizada	0.2	
Lavado 3	Agua reciclada	0.5	
Secado	Aire (filtro absoluto)	0.2	mínima 250 máxima 305

Esterilización			mínima 250 máxima 300
Enfriamiento	Aire (2 filtros)	0.2	

3.1.5 Sistema de sanitización:

Se realizó la validación del sistema de sanitización utilizado en el área de fabricación, muestreo (de materias primas) y de análisis, con el objetivo de que la cuenta microbiana se mantuviera en los mínimos niveles posibles.

La primera evaluación fué el reto microbiológico "in vitro" de los sanitizantes, que consistió en reducir una población bacteriana de $75-125 \times 10^6$ ufc/ml, en un 99.99 %.

Los microorganismos empleados en la prueba fueron los siguientes:

MICROORGANISMO	ATCC
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	10145
<u>Escherichia coli</u>	8739
<u>Staphylococcus aureus</u>	6538-p
<u>Bacillus subtilis</u>	6633

La segunda etapa consistió en reto microbiológico en superficie simulada, los sanitizantes evaluados fueron los mismos de la primera etapa y los microorganismos utilizados fueron los siguientes:

MICROORGANISMO	ATCC
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	10145
<u>Candida albicans</u>	10231

<u>Aspergillus niger</u>	16404
<u>Staphylococcus aureus</u>	6538-P
<u>Bacillus subtilis</u>	6633

La tercera etapa consistio en la prueba de muestreo de superficie "in situ", durante tres dias consecutivos en tres semanas consecutivas, antes de realizar la operaci3n de sanitizaci3n y despues de 3sta.

La cuarta etapa consistio en evaluar la rotaci3n de los sanitizantes, estos se cambian semanalmente.

3.1.6 Arranque de 3reas est3riles:

Cuando se tienen periodos prolongados sin producci3n y en mantenimiento mayor de las 3reas o equipos, antes de reiniciar labores productivas, se hace una evaluaci3n general de las 3reas en cuanto a instalaciones, condiciones ambientales, equipo, personal y sistema cr3tico aire. La evaluaci3n de las condiciones ambientales y del aire incluye el monitoreo f3sico y microbiol3gico de aire y muestreo microbiol3gico de superficies de equipos y 3rea, esta evaluaci3n debe ser satisfactoria, es decir, la cuenta de part3culas y microbiana debe ser menor a los l3mites m3ximos especificados.

3.1.7 Otros Estudios:

Se han realizado otros estudios que tienen que ver con el proceso de llenado as3ptico, pero no directamente con el llenado simulado con medio de cultivo, V.gr:

- 3.1.7.1 Se ha determinado el efecto "bacteriost3tico y fungist3tico" de algunos de los polvos est3riles llenados en el 3rea evaluada en el presente estudio, esto es, una vez concluida la prueba de Esterilidad ya sea por m3todo directo o filtraci3n (sistema

abierto o Steritest), 7 días después de su incubación, a los contenedores del medio de cultivo, caldo soya o medio fluido de tioglicolato, más el producto (método directo) o la membrana (filtración) y la penicilinas, se les agregan menos de 100 ufc/ml de las cepas señaladas en el Cuadro siguiente.

Cuadro 4. Medios de cultivo y microorganismos utilizados en la prueba de "Bacteriostasis y Fungistasis".

Medio de cultivo	Microorganismo	ATCC
Caldo Soya	<u>Candida albicans</u>	10231
	<u>Staphylococcus aureus</u>	6538-p
	<u>Bacillus subtilis</u>	6633
Medio fluido de tioglicolato	<u>Clostridium sporogenes</u>	11437

Los tubos se reincuban por 7 días más, a 20-25°C el caldo soya y 30-35°C el medio fluido de tioglicolato, el crecimiento debe ser visible a los 7 días.

- 3.1.7.2 Se realizó la determinación de trazas de penicilina en el ambiente de fabricación para estimar la cantidad de penicilinas a agregar en la prueba de esterilidad del frasco vacío, el resultado ha sido utilizado para estimar la cantidad de penicilinas concentrada a agregar al medio de cultivo utilizado en el llenado simulado. La evaluación se realizó cuantificando la cantidad de restos de penicilina en el frasco vacío y muestreo de superficies con hisopo, mediante el método de valoración microbiológica de antibióticos por cilindro-placa y semicuantitativamente mediante placas de exposición. El método cuantitativo dio resultados, mientras que el método semicuantitativo no, los resultados fueron muy irregulares y en

base a los resultados más altos de penicilina y a la actividad de la penicilinasa, se calculó la cantidad a agregar en la prueba de esterilidad del frasco vacío . Finalmente se hicieron pruebas de la no inhibición de la penicilinasa sobre el crecimiento de los microorganismos (5.2.02, 27, 34).

3.1.7.3 Calificación termodinamica y microbiológica del horno "VECO" y autoclave "FEDEGARY".

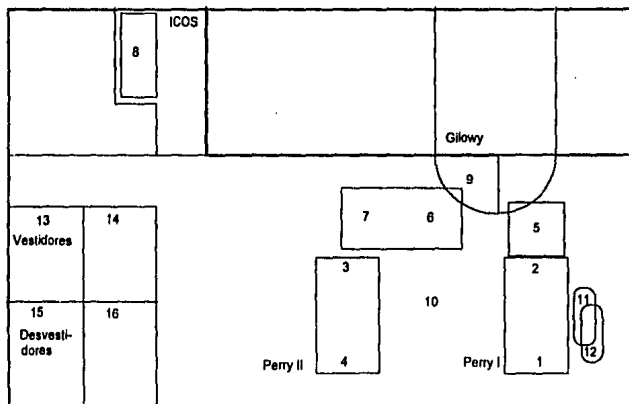
3.2 Preparación del Llenado simulado con Medio de Cultivo:

3.2.1 Evaluación y aprobación del ambiente de fabricación:

La evaluación de los procedimientos de sanitización, la sanitización misma y el ambiente de fabricación, se efectua algunos días antes del llenado aséptico, mediante un monitoreo microbiológico del ambiente de fabricación, durante tres días consecutivos, tomando en cuenta los limites que establecen los procedimientos de Control microbiológico en Areas Estériles, y el Protocolo de Arranque de las áreas estériles, para aprobar el ambiente del Area de llenado.

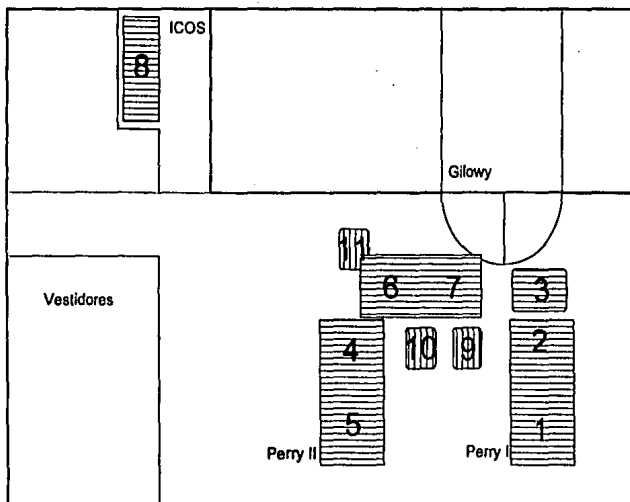
a) Exposición de placas. El Agar soya y micofilico se prepara de acuerdo al método de preparación recomendado por el proveedor y por el Laboratorio de Microbiología. Se pesaron 40 g del medio deshidratado, por cada litro de agua destilada, se agitó e hirvió hasta su completa disolución, se esteriliza en autoclave a 118-121°C y a no más de 15 libras por pulgada cuadrada de presión de vapor, se dejo enfriar hasta una temperatura de 45-50°C, se agrega 2.5 ml de penicilinasa concentrada por litro de medio y se vertió en cajas Petri de poliestireno desechables de 100 X 15 mm. Cada una de estas placas se expusieron en las estaciones indicadas en la Figura 3, por 45 minutos, se incubaron durante 48 horas a 30-35°C y 5 días a 20-25°C.

Figura 2. Exposición de placas.



b) Muestreo con Biotest. El detector ambiental centrífugo Biotest, funciona a base del principio de impactación, recolectando los microorganismos del aire y depositandolos en medio de cultivo. El cilindro se esteriliza junto con las aspas, durante 20 minutos a 121°C , los tiempos de muestreo fueron de acuerdo al lugar de muestreo; campanas de flujo laminar: 4 minutos, filtros absolutos: 2 minutos; Se colocaron las tiras de agar en el cilindro y se efectuó el muestreo en los lugares indicados en la Figura 3, utilizando tiras con agar soya y penicilinas, para cuenta de bacterias y agar micofílico para hongos, se incubaron durante 48 horas a $30-35^{\circ}\text{C}$ y 5 días a $20-25^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

Figura 3. Lugares de muestreo con muestreador de aire centrífugo Biotest.



 Campanas de flujo laminar

 Filtros absolutos

c) Muestreo de superficies. Mediante muestreadores por contacto con agar, se muestrearon las superficies del Area, el equipo y el personal que labora en el área donde se realizó la validación, colocando la superficie del agar del muestreador directamente sobre el lugar de muestreo, utilizando

muestreadores con agar soya, penicilinas y neutralizante para cuenta de bacterias y agar micofílico con neutralizante para hongos, se incubaron durante 48 horas a 30-35°C y 5 días a 20-25°C respectivamente.

3.2.2

Preparación del polvo de llenado:

A) Procedimiento utilizando como polvo de llenado Caldo Soya Trypticaseína deshidratado.

Se pesaron 5 Kg de Medio de Cultivo Caldo Soya tripticaseína deshidratado por maquina a llenar, se selló y protegió con doble bolsa de plástico.

Se irradiaron con 1.5-2.5 Megarrads de cobalto 60 para su esterilización.

Se realizó la prueba de Esterilidad: Abriendo cada bolsa, en el Area Estéril del Laboratorio de Microbiología, bajo flujo laminar, asépticamente se tomaron de cada bolsa irradiada, aproximadamente 6.0 g, y se agregaron 0.3 g a cada uno de 20 tubos conteniendo 90 ml de Caldo Soya y 20 tubos conteniendo 90 ml de Medio Fluido de Tioglicolato, se incubaron 7 días, a 20-25°C y 30-35°C respectivamente.

Se le efectuó la prueba de promoción de crecimiento de los microorganismos, reconstituyendo el polvo del Medio irradiado en tubos conteniendo 90 ml de agua destilada estéril y utilizando menos de 100 ufc por cada una de las cepas sugeridas por la bibliografía, y algunas de las cepas encontradas en el control ambiental del área a validar, de éstas últimas siempre se utilizó mínimo un Coco Gram (+) y un Bacilo Gram (+).

Cepa	ATCC
<u>Bacillus subtilis</u>	6633

<u>Candida albicans</u>	10231
<u>Staphylococcus aureus</u>	6538-P
<u>Aspergillus niger</u>	16404
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	
<u>Staphylococcus sp</u>	
<u>Bacillus sp</u>	

B) Procedimiento utilizando como polvo de llenado

Polietilenglicol 8000:

Se preparó el Polietilenglicol 8000 moliendolo hasta obtener un tamaño de partícula similar o igual al de los polvos llenados comúnmente en el área a probar, partículas menores de 140 micras. Una vez hecho lo anterior se pesaron 5 kg mínimo del polvo de PEG 8000, por máquina, cuando la dosis de polvo planeada a llenar fue menor a 500 mg por frasco, esto debido al diseño del equipo. A dosis planeadas, mayores a 500 mg por frasco, se hizo la equivalencia para llenar un mínimo de 3500 frascos por evento. Se protegió y sello con doble bolsa de plástico.

Se irradiaron con 1.5-2.5 Megarrads de cobalto 60 para su esterilización.

Se hicieron pruebas de disolución del Polietilenglicol irradiado en Caldo Soya Trypticascina, las proporciones de cada uno fueron tomadas de acuerdo a las cantidades de polvo a llenar, la cantidad de medio y el tamaño de frasco vial a utilizar, en el llenado simulado (Cuadro.5).

La prueba de no inhibición del crecimiento del PEG 8000 irradiado sobre los microorganismos, se realizó en tubos conteniendo 90 ml de Caldo Soya a diferentes concentraciones de polvo y con menos de 100 ufc por ml de Bacillus subtilis ATCC 6633 y Candida albicans ATCC 10231.

3.2.3 Preparación del Medio de Cultivo:

A) En el primer procedimiento, el polvo de llenado es el mismo medio de cultivo deshidratado.

B) En el segundo procedimiento se prepararon vol menos de medio de cultivo líquido de acuerdo a los tamaños de frasco a llenar, como se muestra en el siguiente.

Cuadro 5.

Dosis de PEG	Tamaño del frasco	Dosis de Medio de Cultivo por frasco	Volumen de Medio para 3500 frascos
Hasta 500 g	10 o 12 ml	5 ml	17.5 litros

Se sigue el método de preparación recomendado por el proveedor y por el Laboratorio de Microbiología. Se pesaron 30 g del medio deshidratado por cada litro de agua destilada, se agitó e hirvió hasta su completa disolución, se vertió en botellas o matraces de vidrio autoclaveables, máximo de 6.5 litros por botella, se esteriliza en autoclave a 118-121°C y a no más de 15 libras por pulgada cuadrada de presión de vapor, y se deja enfriar lentamente. Se verifica el pH a 25°C.

A cada lote de Caldo Soya -un lote se considera a cada volumen de medio de cultivo preparado al mismo tiempo y esterilizado en un mismo ciclo de autoclaveado pudiendo estar en diferentes contenedores- se le efectuó la prueba de promoción de crecimiento de los microorganismos, en tubos conteniendo 90 ml de Caldo Soya, utilizando menos de 100 ufc por ml de las cepas sugeridas por la bibliografía y algunas de las cepas encontradas en el control ambiental de área a validar, de éstas últimas siempre se utilizó mínimo un Coco Gram (+) y un Bacilo Gram (+), estas son:

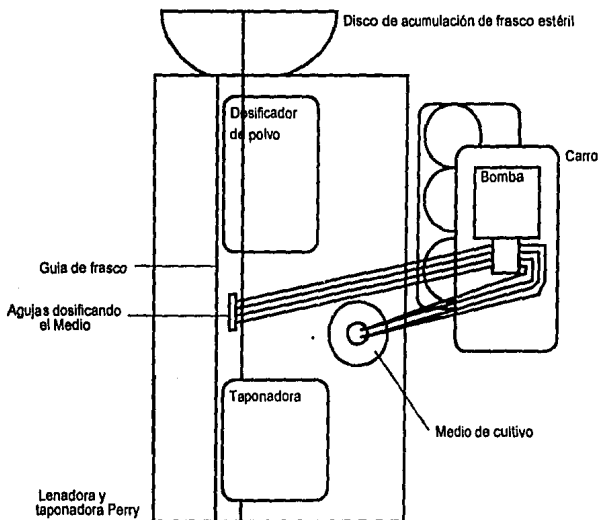
Cepa	ATCC
<u>Bacillus subtilis</u>	6633
<u>Candida albicans</u>	10231
<u>Staphylococcus aureus</u>	6538-P
<u>Aspergillus niger</u>	16404
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	
<u>Staphylococcus sp</u>	
<u>Bacillus sp</u>	

3.2.4 Preparación del Area:

Las 2 líneas de llenado evaluadas, se encuentran en una misma área aséptica. Las dos llenadoras son marca "Perry" (I y II), son alimentadas por el mismo tunel procesador de frasco marca "GYLOWY" y tapón de la procesadora marca "ICOS", ver Figura 1.

En el caso del procedimiento utilizando PEG 8000 como polvo de llenado, se hicieron pruebas preliminares de llenado sin llenar el polvo, y utilizando agua estéril en vez de medio de cultivo líquido. Debido a la velocidad de llenado de la bomba dosificadora de líquidos en comparación con la velocidad de la máquina llenadora, se hicieron las modificaciones en cuanto a la técnica de manejo, al acomodo del equipo y material, obteniéndose la velocidad de llenado satisfactoria. Figura 4.

Figura 4. Ubicación de materiales para el llenado simulado.



Una vez terminado el turno de trabajo productivo, día anterior al llenado con Medio de Cultivo, se desmonta y desarma el equipo de dosificación de polvo, se saca del Area Estéril, se lavo y enjuago perfectamente con jabón, agua potable caliente y fría, y finalmente se enjuaga con agua desmineralizada. Se arma nuevamente y se coloca dentro del autoclave, ya durante la noche, se esteriliza a 121°C por 30 minutos a una presión de 1.4 Kg/cm^2 . También al terminar el turno productivo, se saca todo tipo de material del Area y de los vestidores y desvestidores (guantes, bolsas, uniformes, frascos, etc.). Se limpia con un jalador cubierto con esponja y humedecido con la solución

germicida en turno (se cambia semanalmente) pasándolo por techos y campanas, recorriéndolo en una sola dirección en todas las superficies. La máquina dosificadora de polvo, las bandas transportadoras de frasco y los discos de acumulación se limpiaron con una esponja y sanitizante.

Las paredes, puertas, ventanas y pisos, se rociaron con una solución limpiadora y posteriormente con una solución sanitizante mediante un equipo de aspersión y con la ayuda de un jalador con esponja limpia, esparciendola uniformemente de arriba hacia abajo, en una sola dirección. Se limpiaron y sanitizaron las charolas de los tapetes sanitarios (esponjas en la entrada de los desvestidores del Area Estéril), se lavaron las esponjas y humectaron con el germicida en turno. Ya cerca de la hora de inicio de operaciones para el llenado, se verifica el funcionamiento de las campanas de flujo laminar, que la humedad relativa fuera menor de 45 %, que las presiones positivas fueran mínimo de 0.05 pulgadas de agua. A su vez se verifica que las presiones de agua potable, desmineralizada y de aire, que alimentan las lavadoras-esterilizadoras de frasco y de tapón fueran mínimo de 0.5 Kg/cm², que el drenado para la sanitización de las líneas de agua desmineralizada de las lavadoras de tapón y de frasco fueran correctas, se aspiraron las lavadoras de frasco y los t neles de esterilización.

Se inicia el funcionamiento de las lavadoras, esterilizadoras y despirogenizadoras de frasco, alimentándolas con frasco hasta llenar los t neles de esterilización y despirogenización, verificando las temperaturas de los t neles y su presión diferencial. Se inicio con el lavado, esterilizado y secado de tapón de hule gris clorobutilo o se verificó que hubiera tapón estéril en la campana de enfriamiento.

Concluido el ciclo de esterilización del equipo de llenado desarmable, se saca dentro del Area Estéril ya sanitizada y se

coloca sobre el equipo para su ensamble y ajuste.

Durante los llenados se verificó:

- Presión diferencial
- Humedad relativa
- Funcionamiento de la campanas de flujo laminar
- Variación del peso del polvo dosificado
- Hermeticidad del frasco vial
- Engargolado del frasco

Se efectuó el monitoreo ambiental durante el llenado de igual manera que el descrito en el punto 3.2.1.

3.3 Procedimiento del Llenado Aséptico simulado con Medio de Cultivo:

3.3.1 Procedimiento de Operación:

a) Procedimiento utilizando como polvo de llenado Caldo Soya Tripticaseina deshidratado:

Una vez dentro del área, el personal operativo introdujo la materia prima (Caldo Soya deshidratado irradiado) por la esclusa diseñada para ello, se agregó el polvo a la tolva y se inicio el llenado ajustando el peso en las maquinas dosificadoras de polvo, se agregó el tapón a su tolva correspondiente y el casquillo de aluminio a la engargoladora fuera del área Estéril.

Se utilizó frasco vial de 25 ml, y una dosis de 255 mg por frasco +/- 10 %.

Al inicio del llenado hubo dificultad en el ajuste de peso, debido a que los operadores no conocían el polvo, hubo retraso en el ajuste de los punzones, pero una vez ajustados, el llenado fue rápido.

b) Procedimiento utilizando como polvo de llenado

Polietilenglicol 8000:

Una vez dentro del área el personal operativo, se introdujo la materia prima (PEG 8000) por la esclusa diseñada para ello, se agregó el polvo a la tolva y se inicio el llenado ajustando el peso en las máquinas dosificadoras de polvo, se agregó el tapón a su tolva correspondiente y el casquillo de aluminio a la engargoladora fuera del área Estéril. Se instaló la bomba peristáltica dosificadora de líquidos a un lado de la llenadora, se colocaron las mangueras, un extremo en el Medio de Cultivo y el otro en las agujas dosificadoras, el cabezal de la bomba dosifica hasta con 4 mangueras al mismo tiempo, se conectó el pedal de control de avance y se calibró la bomba para que dosificara 5 ml de medio por manguera a cada frasco. Se inició el llenado a baja velocidad, debido al diseño de la bomba que dosificaba el Medio de Cultivo, y se aumento conforme avanzaba el llenado, hubo paros continuos debido a la acumulación del frasco con polvo antes de dosificar el Medio y al cambio de los matraces o botellas del mismo. También, debido a la velocidad de la llenadora de polvo y a las limitaciones técnicas en la instalación y manejo de la bomba que dosificaba el medio de cultivo, muchos de los frascos nicamente eran dosificados con el polvo (PEG 8000) pero sin el Medio de Cultivo, a estos ltimos frascos se les agregó el medio de cultivo en el área estéril del Laboratorio de Microbiología. Finalmente se obtuvo la sincronización entre la bomba dosificadora de líquidos y la llendora del pólvno, realizando un proceso continuo con una velocidad aproximada de 120 frascos por minuto.

3.3.2

Monitoreo del ambiente de fabricación:

Durante el llenado aséptico se efectuó monitoreo ambiental mediante la exposición de placas, muestreo de aire con Biotest y muestreo de las superficies como se indica en los puntos 3.2.1

a), b) y c).

3.4 Pruebas microbiológicas:

3.4.1 Prueba de Bacteriostasis y Fungistasis:

En el primer procedimiento se apartaron 100 frascos llenados con caldo soya deshidratado y reconstituídos con agua estéril. En el procedimiento utilizando PEG 8000 y Medio de cultivo líquido, se apartaron 100 frascos llenados con PEG 8000 y medio de cultivo de Producción y 100 frascos llenados con únicamente PEG 8000 en Producción y Medio de cultivo agregado en el Laboratorio de Microbiología.

Asépticamente, con frascos de todos los llenados realizados, se inocularon mediante una jeringa con aguja de 20 o 21 x 32, 10 frascos con menos de 100 ufc de cada uno de los siguientes microorganismos:

<u>Bacillus subtilis</u>	ATCC 6633
<u>Candida albicans</u>	ATCC 10231
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC 6538-P
<u>Aspergillus niger</u>	ATCC 16404.

También se utilizaron adicionalmente cepas encontradas en el monitoreo ambiental de rutina que se realiza en el área a validar, siempre se utilizó mínimo un Coco Gram (+) y un Bacilo Gram (+):

Staphylococcus epidermidis.
Staphylococcus sacharolyticus
Staphylococcus simulans
Bacillus licheniformis
Staphylococcus hominis

Los frascos inoculados con bacterias y con Candida albicans se incubaron a 30-35°C, los frascos inoculados con Aspergillus niger se incubaron a 20-25°C, todos durante 7 días. En una ocasión se probó B.vulgatus y posteriormente C.esporogenes. Si el 50 % de los frascos, de cada microorganismo, presenta crecimiento visible, la prueba se considera como satisfactoria.

3.4.2 Esterilidad de materiales y Pruebas especiales:

Durante el llenado se muestreo frasco vacío con tapón y retapa, para prueba de esterilidad. Asépticamente y en el Area Estéril del Laboratorio de Microbiología bajo flujo laminar, a cada uno de 10 frascos vacíos se les agregó 5 ml de Caldo soya y a otros 10, 5 ml de Medio fluido de Tioglicolato y se incubaron a 20-25°C y a 30-35°C respectivamente, durante 7 días.

Se tomaron muestras del tapón de la tolva y asépticamente en el Area Estéril del Laboratorio de Microbiología bajo flujo laminar, se añadieron 20 tapones a un tubo conteniendo 90 ml de Caldo Soya y 20 tapones a un tubo conteniendo 90 ml de Medio fluido de Tioglicolato y se incubaron a 20-25°C y a 30-35°C respectivamente, durante 7 días.

3.4.3 Esterilidad de los frascos:

3.4.3.1 Procedimiento utilizando como polvo de llenado Caldo Soya:

Se preparó el Area Estéril del Laboratorio de Microbiología y el material necesario para la reconstitución de cada uno de los frascos. Se preparó Agua destilada estéril suficiente para reconstituir los frascos y los controles. En campana de flujo laminar se agregó al agua destilada estéril 5 ml de penicilinas concentrada por cada litro de agua. A cada vial se le agregó 8.5 ml de la solución preparada, mediante una jeringa de pipeteo

continuo, previamente sanitizada, sumergiéndola y haciendo pasar a través de la jeringa y la manguera el sanitizante en turno y enjuagando posteriormente con agua destilada estéril, en la salida de la jeringa; antes de la aguja, se agregó un filtro para líquidos con una membrana de tamaño de poro de 0.2 micras. Se agregó el agua a cada uno de los frascos, cambiando aguja y filtro cada 50 frascos.

3.4.3.2 Procedimiento utilizando Polietilenglicol 8000 como polvo de llenado y medio de cultivo líquido:

La mayoría de los frascos fueron llenados de polvo PEG 8000 y medio de cultivo en el área de fabricación, pero en una ocasión parte de los frascos solo fueron llenados con el polvo de PEG 8000, a estos últimos se les agregó posteriormente el medio de cultivo, se preparó el Área Estéril del Laboratorio de Microbiología y el material necesario. En campana de flujo laminar se agregó al Medio 5 ml de penicilinas concentrada por cada litro. A cada frasco vial se le agregó 5 ml de Medio mediante una jeringa de pipeteo continuo, previamente sanitizada, sumergiéndola y haciendo pasar a través de ella y la manguera el sanitizante en turno y enjuagando posteriormente con agua destilada estéril, en la salida de la jeringa, antes de la aguja, se añadió un filtro para líquidos con una membrana de un tamaño de poro de 0.2 micras. Se cambió aguja y filtro cada 50 frascos.

3.4.4 Unidades contaminadas:

Todos los frascos de todos los llenados fueron incubados 7 días a 30-35°C y los siguientes 7 días a 20-25°C, se revisaron diariamente todos y cada uno de los frascos para detectar las contaminaciones.

En caso de contaminación, se registró el día en que apareció la

contaminación, el número de la caja, el estado general del frasco, tapón y casquillo de aluminio, en caso de que su estado no fuera correcto el frasco no fue tomado en cuenta como positivo, pero si se aisló y diferenció el microorganismo. Los microorganismos que aparecieron en el monitoreo, se sembraron en Agar Soya para verificar su pureza, realizar la tinción de Gram y observar las características de la colonia y del microorganismo, y en Caldo Soya para conservar la cepa. Se efectuó la diferenciación bioquímica de los microorganismos encontrados en los cuatro primeros llenados. Se tomaron muestras para realizarles la prueba de hermeticidad, a base de la inyección de aire en el interior del frasco y detectando la salida de este por entre el tapón y el frasco (5.2.08). Se incubaron no menos de 3000 frascos por evento.

4.0 **RESULTADOS:**

Se realizaron un total de 12 llenados, 5 para la llenadora II y 5 para la I, en el orden que se muestra en el Cuadro siguiente:

Cuadro 6. Llenados simulados efectuados.

Fecha	Lote	Llenadora
04/10/92	Calsot01	Perry 1
04/10/92	Calsot02	Perry 2
20/02/93	PEG001	Perry 1
30/04/93	PEG002	Perry 1
25/09/93	PEG003	Perry 2
25/09/93	PEG004	Perry 2
11/10/93	PEG005	Perry 2
11/10/93	PEG006	Perry 2
25/10/93	PEG007	Perry 1
25/10/93	PEG008	Perry 1
25/11/93	PEG009	Perry 1
25/11/93	PEG010	Perry 1

4.1 **Resultados de los sistemas y equipos relacionados:**

4.1.1 **Análisis de Agua:**

De los sistemas y equipos involucrados en el llenado aséptico, como es la utilizada en las procesadoras de frasco y tapón, tanques de almacenamiento y vapor:

Cuenta de microorganismos aerobios:

Bacterias	Dentro de límites
-----------	-------------------

Hongos	Dentro de límites
Coliformes	Ausentes

4.1.2 Verificación física del Aire (previa):

Velocidad del aire, filtros	> 0.35 m/s
Velocidad del aire, Campanas	0.35-0.56 m/s
Partículas mayores de 0.5 micras	< 100/pie ³

4.1.3 Procesado de Tapón:

Análisis microbiológico de vapor	Dentro de límites
Registros de esterilización (Presión, temperatura y tiempo)	Correctos

4.1.4 Procesado de Frasco:

Análisis microbiológico de agua	Dentro de límites
Registro de Temperatura del t nel de esterilización	250-300°C

4.2 Evaluación del ambiente de fabricación:

4.2.1 Exposición de placas:

Los puntos de exposición de las placas se muestran en la Figura 2 y las condiciones de las estaciones de exposición se muestran en el siguiente Cuadro.

Cuadro 7. Exposición de placas.

Lugar de exposición	Condiciones	Límite máximo de ufc permitido por placa
1,2,3,4,5,6,7,8	Bajo filtro de campana de flujo laminar	2
9,10,11,12	Area general	3
13,14	Vestidor	4
15,16	Desvestidor	4
Control (+)	Fuera del área	sin límite
Control (-)	Sin abrir	0

En general todos las cuentas de ufc fueron dentro de limites, cuando no lo fueron, si la verificación de los filtros fue correcta, se reforzó la sanitización.

4.2.2 Muestreo microbiológico del aire con Biotest:

Los puntos de muestreo se muestran en la Figura 3, y las condiciones en el Cuadro siguiente.

Cuadro 8. Muestreo con Biotest.

Lugar de muestreo	Condiciones	Límite máximo de ufc permitido por metro c bico
1,2,3,4,5,6,7,8	Filtro de campana de flujo laminar	8
9,10,11	Filtro de absoluto del área general	12
Control (+)	Fuera del área	sin límite

Control (-)	Sin abrir	0
-------------	-----------	---

En general todas las cuentas de ufc fueron dentro de límites, cuando no lo fueron, si la verificación de los filtros fue correcta, se reforzó la sanitización.

4.2.3 Muestreo microbiológico de superficies:

Las condiciones y los lugares de muestreo se indican en el siguiente Cuadro.

Cuadro 9. Muestreo de superficies.

Lugar de muestreo	Condiciones	Límite máximo de ufc permitido por cada 25 cm cuadrados
Disco de acumulación del frasco (2)	Bajo flujo laminar	2
Tolva polvo		
Tolva tapón		
Base llenadora		
Puerta	Area general	5
Paredes		
Piso		
Control (+)	Fuera del área	sin límite
Control (-)	Sin abrir	0

No se detectaron cuenta de ufc fuera de límites en ninguno de los muestreos que se realizaron.

4.3 Análisis al Polvo de llenado

4.3.1 Procedimiento utilizando caldo soya deshidratado como polvo de

llenado:

Prueba de Esterilidad	Es estéril
Prueba de promoción de crecimiento de los microorganismos	Satisfactoria
Cuenta de ufc por ml de inóculo	10-100 ufc/ml

4.3.2 Procedimiento utilizando PEG8000 como polvo de llenado:

Prueba de Esterilidad	Es estéril
Prueba de disolución en medio decultivo caldo soya	Satisfactoria
Prueba de no inhibición del PEG8000 sobre el crecimiento de los microorganismos	Satisfactoria

4.4 Análisis de Medios de cultivo:

4.4.1 Procedimiento utilizando medio de cultivo deshidratado estéril irradiado como polvo de llenado:

Mencionados en 4.3.1.

4.4.2 Procedimiento utilizando PEG8000 como polvo de llenado y medio de cultivo líquido:

Registros de preparación	Correctos
Registros de esterilización	Correctos
Prueba de Esterilidad	Es estéril
Prueba de Promoción de crecimiento de los microorganismos	Correcta

4.5 Registros durante el llenado aséptico:

Presión diferencial del área estéril	> 0.05 pg H ₂ O
Humedad relativa	> 45 %
Variación de peso	+/- 10 %
Hermeticidad del frasco	Correcta
Reporte del área de llenado:	
Área limpia	Correcto
Área y equipos identificados	Correcto
Equipo limpio	Correcto
Equipos de medición dentro de períodos de calibración	Correctos
Documentos de fabricación	Correctos
Materiales que no correspondan al producto llenado	No se encuentran
Personal con uniforme y equipo adecuado	Correcto
Horario de actividades	Registrado

4.6 Monitoreo ambiental durante el llenado aséptico:

4.6.1 Exposición de placas:

Los puntos de exposición de las placas se muestran en la Figura 2, y las condiciones de las estaciones de exposición se muestran en el Cuadro 7.

En general todos las cuentas de ufc fueron dentro de límites, pero en los llenados donde los resultados no fueron satisfactorios se identificó el microorganismo.

4.6.2 Muestreo microbiológico del aire con Biotest:

Los puntos de muestreo se muestran en la Figura 3, y las condiciones en el Cuadro 8.

En general todos las cuentas de ufc fueron dentro de limites.

4.6.3 Muestreo microbiológico de superficies:

Las condiciones y los lugares de muestreo se indican en el Cuadro 9.

Durante el llenado se agregaron dos puntos más de muestreo, que no se consideran en el Cuadro 9, la bomba peristáltica dosificadora del medio de cultivo líquido y el contenedor de medio de cultivo, los dos sitios con un limite máximo permitido de ufc de 2.

No se detectaron cuenta de ufc fuera de limites en ninguno de los muestreos que se realizaron.

4.7.1 Pruebas microbiológicas:

Prueba de bacteriostasis y fungistasis con aerobios	Satisfactoria
Prueba de bacteriostasis y fungistasis con anaerobios	Insatisfactoria
Cuenta de ufc por ml de inóculo	10-100 ufc/ml

4.7.2 Esterilidad de los materiales y pruebas especiales:

Esterilidad de frasco vacío	Es estéril
Esterilidad del tapón	Es estéril
Prueba de hermeticidad	Correcta

Nota: En el primer llenado se encontró un frasco contaminado.

4.7.3 Esterilidad de los frascos:

El Cuadro siguiente muestra los resultados de todos los

llenados simulados de la línea No.1 (Perry I) del presente estudio:

Cuadro 10. Resultados de la llenadora I (Perry I).

Llenado	Lote	Frascos llenados	Frascos (+)	Porcentaje de (+)
1	Calsot01	3630	8	0.22
2	PEG001	3705	6	0.108
3	PEG002	3686	2	0.054
4	PEG007	3735	94	2.52
5	PEG008	4122	134	3.25
6	PEG009	3681	14	0.38
7	PEG010	3997	11	0.27
	Promedio	3793.7	38.43	1.013

En el llenado No.3, parte de los frascos de prueba fueron reconstituidos con medio de cultivo en el laboratorio de Microbiología.

El Cuadro siguiente muestra los resultados de todos los llenados simulados de la línea No.2 (Perry II) del presente estudio:

Cuadro 11. Resultados de la llenadora II (Perry II).

Llenado	Lote	Frascos	Frascos (+)	Porcentaje de (+)
1	Calsot02	4290	8	0.1865
2	PEG003	3396	3	0.086
3	PEG004	3476	64	1.84
4	PEG007	3697	1	0.027

5	PEG008	4088	4	0.098
	Promedio	3789	16	0.098

Los llenados No.1 y 2 se efectuaron mediante el procedimiento utilizando como polvo de llenado caldo soya, los demás fueron utilizando el método con Polietilenglicol 8000 como polvo de llenado y medio de cultivo liquido.

4.7.4 Unidades contaminadas:

Se efectuó la identificación de las cepas que aparecieron en los frascos contaminados en los primeros 4 llenados, las cepas identificadas fueron las siguientes:

Staphylococcus gallinarum en 6 frascos.

Neisseria elongata en 3 frascos.

Micrococcus nishinomiyaensis en 2 frascos.

Bacillus licheniformis en 2 frascos.

Bacillus globisporus.

Staphylococcus simulans.

Staphylococcus auricularis en 4 frascos.

Staphylococcus hominis

Staphylococcus saccharolyticus.

Staphylococcus cohnii

Micrococcus halobius

Las cepas encontradas en el control ambiental del área de producción son las siguientes:

Staphylococcus simulans

Staphylococcus saccharolyticus en 2 muestreos.

Kingella indologenes en 2 muestreos.

Staphylococcus auricularis en 2 muestreos.

La cepa encontrada en la prueba de esterilidad del frasco vacío del llenado No.1 es Staphylococcus saccharolyticus.

Durante la reconstitución de los frascos en el área de siembra del Laboratorio de Microbiología, del llenado No.1, se encontró Bacillus licheniformis en el muestreo de las manos del analista.

No se identificaron las cepas que aparecieron en los frascos contaminados, ni del control ambiental, de los llenados posteriores ya que principalmente las contaminaciones encontradas son bacterias consideradas no patógenas, saprofiticas, casi todas provenientes de cavidades humanas, principalmente boca y/o nariz, careciendo de importancia médica, salvo en poblaciones inmunodeprimidas. S.hominis ha sido relacionada con infecciones de vías urinarias, septicemia e infecciones de heridas, S.cohnii también puede ser importante en infecciones de vías urinarias y de heridas relacionadas con endocarditis y septicemia.

Una vez comprobado el origen de las contaminaciones, se descarto la posible fuente de contaminación de los materiales y las materias primas. Aunque no todas las cepas de los frascos contaminados aparecieron en el control ambiental, si hay una relación entre las cepas procedentes de las dos fuentes, ambiente-frascos contaminados, Staphylococcus simulans, Staphylococcus saccharolyticus y Staphylococcus auricularis. La cepa encontrada en el frasco vacío, Staphylococcus saccharolyticus, no se relaciona con ninguna cepa de frasco contaminado, pero si con el control ambiental de un mismo llenado.

5.0 CONCLUSIONES:

5.1 El área aséptica evaluada en el presente estudio es capaz de llenar polvos de una calidad microbiológica aceptable en cuanto a su esterilidad, de acuerdo con los documentos oficiales, tanto nacionales como internacionales. Aunque en una de las dos líneas de llenado (Perry I) el resultado no fué satisfactorio, en cuanto a obtener tres resultados dentro del límite establecido (máximo 0.1% de frascos positivos) las dos líneas son muy similares y se encuentran en una misma área, las provee de frasco el mismo t nel y de tapón, la misma procesadora, el manejo de las materias primas y materiales es el mismo. Y ya que las contaminaciones de los primeros llenados con resultados insatisfactorios fueron claramente relacionadas con el personal del área, se descartaron como posibles fuentes de contaminación a los materiales, equipos, medios de cultivo, materia prima etc. La nica dificultad para obtener resultados satisfactorios con llenados simulados y garantizar la calidad microbiológica del proceso y de los productos, son las prácticas del personal, como son:

- Aseo personal (baño y boca).
- Comportamiento y movimientos dentro del área.
- Control y supervisión más efectivo del personal del área.
- Lavado de manos antes de entrar al área.
- Prácticas de simulación.
- Procedimientos detallados de operación.
- Ropa interior y de trabajo.
- Tiempo de permanencia continua dentro del área.
- Vestido del uniforme del área.

5.2 Dados los resultados del control ambiental se sugiere hacer un

estudio con diferentes métodos de muestreo microbiológico de superficies y de muestreo microbiológico del aire con Biotest principalmente con diferentes tiempos de muestreo y validar los procedimientos.

5.3 En la línea de llenado No.1 (Perry I) en los 7 llenados se obtuvo un promedio de piezas contaminadas de 1.013%. En la línea de llenado No.2 (Perry II) en los 5 llenados se obtuvo un promedio de piezas contaminadas de 0.422%.

5.4 Si se realizan 250 pruebas de esterilidad (días trabajados al año aproximadamente) con muestras de la línea de llenado No.1, una para cada día de llenado, y el 1.013% de las piezas por día estubiese contaminado, la probabilidad de detectarlo es del 20%, aproximadamente el resultado de 50 de las 250 pruebas sería No estéril.

Si se realizan 250 pruebas de esterilidad con muestras de la línea de llenado No.2, una para cada día de llenado, y el 0.422% de las piezas por día estubiese contaminado, la probabilidad de detectarlo es del 8.5%, aproximadamente el resultado de 21 de las 250 pruebas sería No estéril.

Estas conclusiones no concuerdan con los resultados de las pruebas de esterilidad. Si los microorganismos contaminantes se encontraran viables en el interior del producto, se detectarían en la prueba. Es evidente que en el proceso normal el efecto que causa el antibiótico sobre los microorganismos contaminantes es letal.

La mayoría de los microorganismos encontrados en el monitoreo ambiental del área, en los positivos de la prueba de esterilidad y en el llenado simulado son cocos Gram (+) y bacilos Gram (+), saprófitos, no patógenos, más que en poblaciones inmunodeprimidas, no habiéndose reportado nunca infecciones por la aplicación de los productos llenados en el área evaluada. Por lo que es indispensable:

- **Evaluar la viabilidad-estabilidad de diferentes clases de microorganismos en el interior del producto (tiempo).**
- **Cuantificar el efecto de la penicilinasa sobre los diferentes antibióticos llenados en el área.**
- **Realizar pruebas completas con diferentes cantidades de medio de cultivo, penicilinasa y antibiótico, en la prueba de bacteriostásis y fungistásis.**
- **Validar la prueba de esterilidad con todos los antibióticos en sus diferentes dosis.**

5.0 BIBLIOGRAFIA:

- 5.1.01. A Review of Current Technology in Parenteral Manufacturing. Akers J.E., Agalloco J.P., Carleton F.J., Korczynski M.S.. J.Parent Sci. & Technol., Vol.42, No.2/ March-Abril 1988. pp 285-288.
- 5.1.02. Aseptic Pharmaceutical Manufacturing. Olson W.P. y Grooves.M.J. Interpharm Press, 1987.
- 5.1.03. Aseptic Process Validation. Tetzlaff,R.A. PeMC Industry Sep/Oct 1983. pp 25-28,38.
- 5.1.04. Bioestadística aplicada. Agronomía, Biología, Química. Castañeda P.R.. Trillas. 1982.
- 5.1.05. British Pharmacopoeia. 1988.
- 5.1.06. Code of Federal Regulations. Food an Drugs 21. Parts 300 to 499. 1991.
- 5.1.07. COMMENTARY: FDA Guidline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing: Notice of Availability. BEARY J.F.III.M.D. Pharmaceutical Manufacturers Association. 1988.
- 5.1.08. Current Practices in the use of Media Fills for the Validation of Aseptic Processing. J.Parent Sci. & Technol., Vol.41, No.4. pp 128-141.
- 5.1.09. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Part II-10. 1986
- 5.1.10. Extracted from guidelines on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing. Center for Drugs and Biologics and Office of Regulatory Affairs, Food and Drug Administration. FDA. 1987.
- 5.1.11. Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud. 5a.Ed. 1988.
- 5.1.12. "Guideline of General Principles of Process Validation",FDA. Rockville,Md. March 1983.
- 5.1.13. Handbook of Pharmaceutical Excipients. American Pharmaceutical Association. 1986.
- 5.1.14. Manual de Garantía de Calidad-Control Ambiental. Evaluación

- de Procesos Asépticos de Llenado (Pruebas de Llenado). Medina S. Upjohn México. Septiembre 1987.
- 5.1.15. Microbiology Manual Merck. Merck. Germany. 1992
- 5.1.16. Regulatory Aspects of Aseptic Processing. Tetzlaff, R.F. Pharm. Technol. November 1984. pp 38-44.
- 5.1.17. Sterile Pharmaceutical Manufacturing. Applications for the 1990's. Vol.2. Groves M.J., Olson W.P., Anisfeld. M.H. Interpharm Press. 1991.
- 5.1.18. Systematic Bacteriology. Bergey's Manual. Vol 2. Sneath P.H., Mair N.S., Holt J.G. USA 1984.
- 5.1.19. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Lachman, L., Lieberman H.A. y Kanig, J.L. LEA & FEBIGER. 1986.
- 5.1.20. The United States Pharmacopoeia XXII. 1989.
- 5.1.21. Validation and Environmental Monitoring of Aseptic Processing (COMMENTARY). Committee on Microbial Purity, International Pharmaceutical Federation. J.Parent Sci. & Technol., Vol.44, No.5/ September-October 1990. pp 272-277.
- 5.1.22. Validation and Routine Operation of a Sterile dry powder Filling Facility. Prout G. J.Parent Sci. & Technol., Vol.36, No.5/ September-October 1982.
- 5.1.23. Validation Aseptic Pharmaceutical processes. Carleton F.J. y Agalloco J.P.. Marcel Dekker, Ins., 1986.
- 5.1.24. Validation of Aseptic Processing. Agalloco J. Parenteral Drug Association, Inc.(Educational Course) 1992.
a) Validation of Aseptic Filling Operations. Agalloco J. 1985.
b) Aseptic Processing a Current Perspective. Akers J. & Agalloco J.
- 5.1.25. Viable Environmental Monitoring (Educational Course PDA-AFM). Akers J.E. 1994.
- 5.2 Bibliografía de Farmeacéuticos Lakeside:

- 5.2.01. Método de Análisis. Evaluación de sanitizantes. FL.No.97-80-34, 1a.Ed. Marzo 15, 1991.
- 5.2.02. Método de Análisis. Método de Reactividad de la Penicilinas. FL.MA.No.97-80-21. 3a.ed. Enero 15, 1993.
- 5.2.03. Método de Análisis. Método para determinar la Concentración Microbiológica de Superficies y personal del Area Estéril. FL.MA.No.97-80-10, 1a.ed. Julio 31, 1991.
- 5.2.04. Método de Análisis. Prueba de Esterilidad. FL.MA.No.97-80-01. 4a.ed. Febrero 15, 1993.
- 5.2.05. Método de Análisis. Prueba de Promoción de Crecimiento en Medios de Cultivo para Prueba de Esterilidad. FL.MA.No.97-80-19, 3a.ed. Marzo 30, 1993.
- 5.2.06. Método de Preparación de Medios de Cultivo. Agar de Soya Trypticaseina. FL.No.96-00-18, 4a.ed. Junio 15,1993.
- 5.2.07. Método de preparación de medios de cultivo. Caldo Soya Trypticaseina. FL.No.96-00-33. 3a.Ed. Noviembre 30, 1992.
- 5.2.08. Método para la Determinación de la Hermeticidad en Frasco Ampula cerrado con tapón de goma y fijado con casquillo de aluminio. FL.No.97-70-30. 5a.ed. Agosto 15, 1992.
- 5.2.09. Procedimiento de Operación. Manejo del Detector Centrifugo Biotest RCS. FL.No.03-33-05, 2a.ed. Enero 15, 1993.
- 5.2.10. Procedimiento de sanitización del Area Estéril de Antibióticos Penicilínicos y actividades a realizar en el 3er. turno. FL.No.06-85-10, 4a.Ed. Septiembre 15, 1993.
- 5.2.11. Procedimiento estándar de operación. Control de condiciones de operación al inicio de fabricación y acondicionado en las Areas productivas (Antibióticos, Inyectables y Orales) FL.PEO.No.00-10-40, 4a.Ed. Mayo 30, 1993.
- 5.2.12. Procedimiento Estándar de Operación. Fabricación de Antibióticos Inyectables. FL.No.05-80-01, 6a.ed. Abril 30, 1993.
- 5.2.13. Procedimiento Estándar de Operación. Manual de Prácticas Adecuadas de Manufactura; FL.PEO.No. Manual02. 2a.ed.

- Octubre 30, 1992.
- 5.2.14. Procedimiento estándar de operación. Procedimiento de ajuste y operación de las maquinas dosificadoras Perry's. FL.PEO.No.00-80-20, 1a.Ed. Septiembre 15, 1990.
- 5.2.15. Procedimiento Estándar de Operación. Procedimiento de calificación termodinámica de Procesadora de tapones "ICOS" mediante el DIGISTRIP III. FL.PEO.No.04-00-45. 1a.ed. Enero 15, 1991.
- 5.2.16. Procedimiento estándar de operación. Procedimiento de limpieza y operación del equipo Gilowy. FL.PEO.No.03-83-03, 3a.Ed. Marzo 30, 1993.
- 5.2.17. Procedimiento estándar de operación. Procedimiento de operación de la procesadora de tapones ICOS. FL.PEO.No.03-83-01, 2a.Ed. Abril 30, 1993.
- 5.2.18. Procedimiento estándar de operación. Procedimiento para el lavado y esterilizado de tapón de frasco vial. FL.PEO.No.03-82-20, 3a.Ed. Mayo 31, 1993.
- 5.2.19. Procedimiento estándar de operación. Procedimiento para la validación microbiológica de t neles de esterilización. FL.Depto.de Microbiología, Noviembre 30, 1989.
- 5.2.20. Procedimiento para el doblado, la envoltura y la esterilización del uniforme para el área estéril. FL.No.00-00-02, 3a.Ed. Enero 29, 1993.
- 5.2.21. Procedimiento para el lavado de manos antes de ingresar al Area estéril. Fl.00-00-03. 3a.Ed. Abril 30, 1993.
- 5.2.22. Procedimiento para el Seguimiento de falsos Positivos en la Prueba de Esterilidad, FL.No.00-32-05. 3a.ed. Octubre 31, 1991.
- 5.2.23. Procedimiento para la Calificación de t neles de esterilizado y/o despirogenizado por medio del DIGISTRIP III. FL.No.04-00-12, 2a.Ed. Septiembre 15, 1989.
- 5.2.24. Procedimiento para la exposición de cajas petri. FL.No.97-80-

29. 1a.ed. Marzo 15, 1993.
- 5.2.25. Procedimiento para la Obtención de Suspensiones Microbianas Utilizadas en Microbiología. FL.No.00-32-22. 3a.ed. Agosto 31, 1993.
- 5.2.26. Procedimiento para vestirse con el uniforme área el Area estéril. FL.No.00-00-01. 3a.Ed. Febrero 15, 1993.
- 5.2.27. Protocolo de Evaluación. Determinación de la Concentración de Penicilina en el ambiente del Area de Antibióticos Penicilínicos, para confirmar la concentración de penicilinas empleada. FL.No.10-10-07, Junio 8, 1990.
- 5.2.28. Protocolo de evaluación. Evaluación de Esterilidad en Tapón para frasco vial de Antibiótico durante su manejo en el Area de Llenado Aséptico. FL.Depto.de Microbiología, Abril 22, 1991.
- 5.2.29. Protocolo de Evaluación. Protocolo de Arranque de Areas Estériles de Antibióticos Penicilínicos y Area Estéril de Microbiología por Mantenimiento Mayor. FL. Enero 1, 1992.
- 5.2.30. Protocolo de Validación. Calificación Termodinámica y Microbiológica del t nel de esterilización "GILOGY" del Area de Antibióticos. FL. Julio 1991.
- 5.2.31. Protocolo de Validación. Determinación de la Correlación entre la Presión diferencial y el Flujo Laminar en los Filtros Hepa de las Unidades de flujo laminar del Area de Antibióticos Penicilínicos. FL. Septiembre 4, 1989.
- 5.2.32. Protocolo de Validación. Validación del sistema de Sanitización en las Areas Productivas. FL.Depto.de Microbiología, Julio 6, 1990.
- 5.2.33. Protocolo de Validación. Validación Integral del Proceso de llenado Aséptico mediante la aplicación de pruebas de Llenado simulado con medios de cultivo. FL.No.10-10-06J. Mayo 26, 1993.
- 5.2.34. Reporte de cierre de la Determinación de la concentración de Penicilina Presente en el medio Ambiente del Area de Llenado

-
- de Antibióticos Penicilínicos, para confirmar la concentración de Penicilinas empleada. FL.No.10-10-07, Septiembre 24, 1990.
- 5.2.35. Reporte de cierre de Protocolo de Validación del Sistema de Sanitización en las Areas Productivas. FL.Depto.de Microbiología, Noviembre 6, 1991.

FL= Farmacéuticos Lakeside

PO= Procedimiento de Operación.

PEO= Procedimiento Estandar de Operación.