



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

MICROBIOLOGIA FARMACEUTICA Y SU APLICACION EN LA INDUSTRIA.

293589

MEMORIA DE DESEMPEÑO PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: RUBEN ARREOLA GYVES

ASESOR: Q.F.I. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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 14
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

La Memoria de Desempeño Profesional: "Microbiología Farmacéutica y su aplicación en la Industria".

que presenta el pasante: Ruben Arreola Gyves
con número de cuenta: 9250847-I para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biologo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Octubre de 2000

PRESIDENTE	<u>C.F.I. Andrea A. Becerril Osnaya</u>	<i>Andrea A. Becerril Osnaya</i>
VOCAL	<u>C.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	<u>C.F.B. Virginia Benítez Solís</u>	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Adriana Ganem Rondero</u>	<i>[Firma]</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>C.F.B. Amparo Londoño Orozco</u>	<i>Amparo Londoño Orozco</i>

AGRADECIMIENTOS

**Señor, de todo corazón te doy gracias;
Hablaré de todas tus obras admirables.
Saltaré de alegría, de júbilo;
Cantaré, Oh Dios Altísimo, la gloria de tu Nombre.**

**Gracias por darme la oportunidad de ser Universitario,
Que yo siempre sabré valorar y poner en alto tu nombre.
"Universidad Nacional Autónoma de México"**

**Gracias por ser parte importante de mi vida,
donde pase grandes momentos, pues nos
acogiste como nuestra segunda casa.
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan**

**Gracias a ti Papa: Constancio †
Que dejaste un buen ejemplo, y que
donde quiera que estés siempre
velaste por NOSOTROS.**

**Gracias a ti mama: Obdulia.
Que eres madre y padre cuando
lo necesitamos y gracias a tu esfuerzo
me diste algo muy valioso:
mi preparación.**

**Gracias Alejandro.
Tu esfuerzo no fue en vano,
no importan los problemas si tienes
el apoyo de tu familia.**

**Gracias María Dolores.
Porque me diste la oportunidad de
terminar un proyecto que estaba pendiente
En mi vida. T.Q.M.**

Gracias a mis tíos
Marcial y Claudio Alavez.
Por el apoyo que siempre nos han brindado
Sobre todo en esos momentos difíciles.

A Gist-brocades

Por darme la oportunidad de iniciar
mi vida profesional, acumulando experiencia
para un futuro que apenas
se empieza a escribir.

Gracias a las profesoras
Q.F.I. Andrea Becerril O. por el
asesoramiento de este trabajo;
Q.F.B. Guadalupe Rebollar, Q.F.B. Virginia Benítez,
Dra. Adriana Ganen, Q.B.P. Amparo Londoño
por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Gracias a mis amigos de la Gen 19.

Claudia, Salvador, Margot, Ana, José Antonio, Amador,
Marco, Edmundo, Edgar, Miguel, Rigo, Sara, Carolina,
Pepe, Verónica, Angeles, Enrique L., Rogelio, Memo, Rocío,
Enrique, Minerva, Mariela y todos aquellos con quienes
contamos para salir siempre Adelante.

A mis amigos de trabajo de Gist
Arturo, Sara, Alejandro, Jacobo, Diana, Francisco,
Roque, Eduardo, Vero, Leticia y Janeth I.
A Coral Ramirez por darme la oportunidad y confianza.
A la Q.F.B. Graciela Aguilar por su ayuda y consejos.

DEDICATORIAS.

A MIS PADRES
PORQUE ESTE TRABAJO ES FRUTO
DE TODO EL ESFUERZO DEL CUAL
TODOS FUIMOS PARTE.

A MI HERMANO
QUE FUISTE PARTE IMPORTANTE
Y TU ESFUERZO ES BIEN APROVECHADO.

A MI ESPOSA Y COMPAÑERA.
AMOR, APOYO Y CONFIANZA SON COSAS SIEMPRE
PRESENTES EN UNA RELACIÓN, POR LO QUE ESPERO
CONSIDERES ESTE TRABAJO COMO FRUTO DE ESE AMOR
QUE CRECE DÍA CON DÍA.

A LA UNAM
PORQUE SIEMPRE TIENES ABIERTAS
LAS PUERTAS DEL CONOCIMIENTO
Y LA SUPERACIÓN, PARA QUE TUS FRUTOS
SIEMPRE SEAN LOS MEJORES.

DSM ANTIINFECTIVES
Gist-brocades Industrial Pharmaceutical
Mexicana

1983-2000



INDICE

Nota Introdutoria	1
Abreviaturas	3
Objetivos	4
Introducción	6
 CAPITULO 1	
1. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	10
1.1 Antecedentes.	11
1.1.1 GMP's. Good Manufacturing Practices (Buenas Practicas de Manufactura)	11
1.1.2 ISO. International Organization for Standardization	12
1.1.3 Construcción del Sistema de Aseguramiento de la Calidad en Gist-brocades	13
1.2 Sistema de Aseguramiento de Calidad.	14
1.3 Requisitos del Sistema de Calidad.	15
1.3.1 Responsabilidades de la Dirección Administrativa de la empresa	16
1.3.2 Política de Calidad..	16
1.3.3 Organización para la Calidad	17
1.3.4 Recursos para el Sistema de Calidad	17
1.3.5 Representante de la Dirección para la Administración del Sistema de Calidad.	17
1.3.6 Revisión del Sistema de la Calidad por la Dirección.	18
1.4. Documentación del Sistema de Calidad	18
1.5 Sistema de Administración ISO 14001	21
1.5.1 Política Ambiental.	22
 CAPITULO 2	
2. CONTROL AMBIENTAL	24
2.1 Antecedentes	25
2.2 Condiciones Ambientales	26
2.2.1 Humedad relativa	26
2.2.2 Temperatura	26

2.2.3 Iluminación	26
2.2.4 Clase de aire.	26
2.3 Filtros HEPA	28
2.3.1 Pruebas de Eficiencia de Filtros	28
2.3.2 Prueba de Integridad de Filtros	29
2.3.3 Prueba de Uniformidad.	29
2.3.4 Prueba de conteo de partículas	30
2.3.4 Prueba de Flujo de Aire.	31

CAPITULO 3

3. CONTROL MICROBIOLÓGICO	33
3.1 Antecedentes	34
3.2 Tipos de contaminación	35
3.2.1 Contaminación Microbiana.	35
3.2.2 Bacterias	36
3.2.2.1 Técnicas para el estudio Microscópico de las Bacterias.	36
3.2.2.2 Fuentes de contaminación	39
3.2.2.3 Interacciones entre Microorganismos y Humanos	39
3.3 Identificación por medio de Sistemas Comerciales	42
3.3.1 Principios del procedimiento	43
3.3.2 Identificación de hongos y levaduras	45
3.4 Control de la contaminación: EL PERSONAL	45
3.4.1 Entrenamiento del personal	45
3.4.2 Factores del control de la contaminación	46
3.4.3 Capacitación del Analista	51
3.5 Control de la contaminación: Limpieza y Sanitización	52
3.5.1 Limpieza	52
3.5.2 Sanitización y desinfección	53
3.5.2.1 Tipos de Desinfectantes	54
3.5.2.1 Variables de Desinfección	55

3.6 Métodos de Evaluación Ambiental	57
3.6.1 Factores a considerar en el Diseño de un programa de control Microbiológico	58
3.6.2 Plan y sitios de muestreo	59
3.6.3 Límites de Alerta y Acción	61
3.6.4 Métodos e instrumentos para monitoreo ambiental	66
 CAPITULO 4	
4. ENDOTOXINAS BACTERIANAS	70
4.1 Antecedentes	71
4.2 Naturaleza de los agentes pirogénicos.	71
4.3 Sistema de detección de agentes pirogénicos.	74
4.4 Bases bioquímicas de la prueba LAL	75
4.5 Correlación Hombre-prueba de pirógenos y Lisado de Amebocitos	77
4.6 Factores que pueden interferir la prueba	81
4.7 Aspectos Prácticos.	82
 CONCLUSIONES	84
 ANEXOS	87
ANEXO I ORGANIGRAMA	88
ANEXO II NORMA ISO 9002	91
ANEXO III BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA	95
ANEXO IV CLASIFICACIÓN DE PARTÍCULAS EN AIRE EN CUARTOS LIMPIOS Y ZONAS LIMPIAS FEDERAL STANDARD 209E.	104
ANEXO V PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN: VERIFICACIÓN DE VELOCIDADES DE FLUJO EN EL ÁREA DE PRUEBAS DE ESTERILIDAD	105
ANEXOVI BORRADOR DE UN MEMORANDUM DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	109
 BIBLIOGRAFIA	111

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Ciclo de calidad	13
Fig. 2	Niveles de documentación del sistema de calidad	19
Fig. 3	Certificado ISO 9002	20
Fig. 4	Certificado ISO 14001	23
Fig. 5	Pared Celular de Gram positivos y Gram negativos	38
Fig. 6	Control de Contaminación	48
Fig. 7	Esquema de la ubicación de zonas en áreas aséptica	61
Fig. 8	Biotest RCS	67
Fig. 9	Ubicación de Endotoxinas en la membrana celular.	72
Fig. 10	Estructura de la endotoxina.	73
Fig. 11	Reacción de Gelificación	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de niveles de aire limpio en áreas asépticas	27
Tabla 2.	Clasificación de cambios de aire por hora	32
Tabla 3.	Aspecto durante el proceso de Tinción Gram.	38
Tabla 4.	Resultado del Gram a bacterias comunes	39
Tabla 5.	Perfil Bioquímico de Identificación	44
Tabla 6.	Nombre y principio activo de algunos sanitizantes	56
Tabla 7.	Frecuencias de muestreo en base al grado de control Ambiental.	60
Tabla 8.	Límites Microbianos de aire y superficie en base al <1116>.	62
Tabla 9.	Límites microbianos establecidos en Gist-brocades IPM antes de Implementación ISO 9002	63
Tabla 10.	Límites microbianos después de la implementación del <1116> en Gist-brocades IPM	64
Tabla 11.	Comparación del umbral de sensibilidad de la prueba de pirógenos en el hombre y en el conejo ante Endotoxinas conocidas	78
Tabla 12.	Dosis Mínima Pirógenica (conejos) contra tiempo de gelificación (LAL).	79
Tabla 13.	Sensibilidad del lisado ante varias Endotoxinas	80

NOTA INTRODUCTORIA.

Mi desempeño profesional se inicia el 14 de octubre de 1996, al ingresar a formar parte de la empresa Orfaquim-Gist-brocades, en el puesto de Químico Analista realizando a partir de esa fecha las siguientes actividades:

Monitoreo Ambiental en Areas Asépticas.
Identificación de Microorganismos
Cuenta Microbiológica en agua.
Prueba de Esterilidad de Indicadores Biológicos.
Control de Calidad a Medios de Cultivo.
Procesos de Despirogenización.
Procesos de Esterilización.

En Enero de 1999, la Dirección de Calidad reorganizó las actividades del área de Microbiología, incorporando las siguientes actividades al personal de Monitoreo Ambiental:

Evaluación de Germicidas.
Manejo de Cepas Microbiológicas.
Endotoxinas Bacterianas
Análisis Microbiológico de Materia Prima y Producto Terminado.
Pruebas de Esterilidad.

Esta empresa pertenece al ramo Farmoquímico, produce diferentes tipos de productos Betalactámicos estériles como son: Mezclas de Penicilina G Procaína-sódica, Penicilina G Sódica, Penicilina G procaína, Penicilina G Benzatina, Ampicilina Sódica estéril, Diclaxacilina Sódica estéril, entre otras; así como intermediarios químicos para diversos procesos entre los que encontramos la cadena de cloruro de Dizol (Oxima, Dizol Acido, Dizol), el complejo de sodio purificado, insumos para la fabricación de Penicilina G Sódica; además de la recuperación de solventes como Butanol, Metanol, Acetato de Etilo, entre otros. Mi actividad se enfoca principalmente al Monitoreo Ambiental en las áreas asépticas de producción de Betalactámicos.

La empresa fue fundada originalmente por un grupo de mexicanos teniendo la razón social de **Orfaquim S. A.** la cual inicio operaciones en mayo de 1983. En este lapso de tiempo ha sufrido cambios que le han permitido crecer tanto en el mercado nacional como en el internacional. En 1995 el consorcio holandés **Gist-brocades** (casa matriz en Delf, Holanda) compró el 51% de las acciones de la empresa lo que generó el incremento de las exportaciones al mercado asiático, siendo posteriormente adquirida en su totalidad por el grupo **Gist-brocades** en el año de 1997, como una planta estratégica para las aspiraciones de este grupo en el crecimiento de su mercado tanto a nivel nacional como internacional, y ello generó un cambio en la razón social la cual pasó a llamarse **Gist-brocades Industrial Pharmaceutical Mexicana**.

Tiempo después y debido a la Globalización de la economía el grupo **Gist-brocades** empieza el proceso de fusión con el consorcio holandés denominado **DSM** en 1999 y se pretende terminará en el 2001. Las actividades de **DSM** están agrupadas en tres grupos: Productos de Ciencias de la vida, Realización de Materiales e Industria Química y Polímeros. Los productos principales son Química Fina para la industria Farmacéutica y de Alimentos, además de resinas, materias primas, fibras sintéticas, fertilizantes y productos plásticos. Bajo este nuevo panorama nuestra planta volvió a cambiar de nombre, teniendo actualmente la razón social **DSM Anti-infectivos Gist-brocades Industrial Pharmaceutical Mexicana**.

Mi estancia en dicha compañía me ha permitido conocer varios aspectos importantes de la microbiología farmacéutica a nivel de condiciones de operación, normatividad, aspectos tecnológicos, así como de manejar un sistema de aseguramiento de calidad fundamentado y acorde con los estándares internacionales, cuyo reflejo es la obtención del certificado **ISO 9002** en Diciembre de 1998, y conocer aspectos de seguridad en el trabajo, así como de concientización ecológica de los procesos que se llevaban a cabo, esto se observa en la obtención del certificado **ISO 14000** en Enero del 2000.

Pero dado las condiciones adversas del mercado, con una baja sostenida del precio de los **Betalactámicos** y a una alta competencia, en Marzo del 2000, por decisión de la casa Matriz la empresa terminó operaciones en esta planta.

Abreviaturas

CFR	Codig Federal of Regulations
°C	Grados Celsius
Ft ³	pie cúbico
GMP's	Good Manufacturing Practices
ISO	International Organization for Standardization
HCl	Acido clorhídrico
Kg./kg.	Kilogramo
LAL	Lymulus Amebocyte Lysate
m	metro
m ³ .	metro cúbico
min	minuto
ml	mililitro
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	nanogramo
NOM	Norma Oficial Mexicana
pH	Logaritmo negativo de la actividad del ion hidrógeno
RCS	Reuter Centrifugal Sampler
Rodac	Replicate Organism Detection and Counting
s	segundo
SI	Sistema Internacional
UE	Unidad de Endotoxina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
um	micrómetro
US	Sistema Estadounidense.
USP	United States Pharmacopeial



OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

Proporcionar una visión de los puntos de aplicación de la MICROBIOLOGIA FARMACÉUTICA en la industria, por medio de la experiencia adquirida y fundamentada en datos que reporta la literatura para comprender los diferentes campos de desarrollo farmacéutico, así como la importancia del aseguramiento de la calidad y los puntos normativos en este campo de trabajo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Distinguir los diferentes procesos, sistemas y métodos microbiológicos en el campo de aplicación en la práctica profesional.
- Explicar la importancia de la implantación de un Sistema de Calidad.
- Copilar e interrelacionar las áreas de interés de la Microbiología Farmacéutica la cual sustenta los planes de trabajo de áreas asépticas.
- Identificar los puntos normativos de importancia para la correcta operación de procesos asépticos.
- Vincular y relacionar de manera importante los procesos asépticos y los que derivan de ellos, en el campo de aplicación del Q.F.B.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Uno de los principios generales en la industria actual se basa en la calidad de los productos, la cual debe ser construida a lo largo de un proceso de manufactura cuyo diseño, evaluación y control, permitan asegurar la reproducción fiel del producto diseñado originalmente. Por ello, el esfuerzo productivo de la moderna empresa farmacéutica debe verse complementado tanto por los avances tecnológicos, como de sus procedimientos generales de evaluación, operación manejo y control así como de la adecuada administración de los recursos humanos (GUÍA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA FARMACEUTICA, 1989).

Los cambios que están teniendo lugar en el mundo, nos obligan a una acelerada actualización si queremos adecuar las empresas a las nuevas tecnologías para suplir las demandas surgidas como consecuencia de la Globalización.

Pero también es cierto, debemos cumplir con una serie de requisitos normativos, los cuales nos guíen en el desarrollo de métodos adecuados y funcionales destinados a efectuar los procesos de manufactura de medicamentos y su control. Por lo tanto no se debe perder de vista el deber de cumplir con los requerimientos mínimos exigidos para la fabricación de productos farmacéuticos (NOM -059-SSA1 BUENAS PRACTICAS DE FABRICACION PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO-FARMACEUTICA, 1995.) (NOM-060-SSA1 REGULACIÓN SANITARIA PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUIMICO-FARMACÉUTICA , 1995).

A nivel nacional nos encontramos con la NOM-059- SSA1-1993, NOM-060-SSA1-1993 y algunas otras publicaciones como es la Guía de Prácticas Adecuadas de Manufactura Farmacéutica, que están en concordancia con la norma ISO 9000, o con las elaboradas en los Estados Unidos por la agencia de salud: *Federal Drugs Administration* (FDA por sus siglas en Inglés) por medio del Código Federal de Regulaciones (CFR) (21 CFR , Parte 211 1992) , (ISO 9002, Curso Sistema de Calidad, 1998).

La industria farmacéutica ha generado diversas disciplinas las cuales han atendido los diferentes retos presentados en su propio desarrollo, el objetivo de este trabajo es integrar de manera adecuada la información y conocimientos, obtenidos de una parte

de las ciencias farmacéuticas: la Microbiología Farmacéutica, y en este caso es importante, por el tipo de productos fabricados en esta empresa, los denominados: PARENTERALES.

El trabajo se divide en diferentes partes, cada una de ellas versará sobre un tema diferente pero en conjunto están relacionados entre sí.

- **Sistema de Aseguramiento de la Calidad.**

En su forma más básica implica conocer la forma de trabajar de manera apropiada por medio de una serie de ideas, métodos y procedimientos bien establecidos y unificados, el que se debe hacer, el cómo, el quién, el dónde, con que, porqué y todos los aspectos para planificar y organizar la estrategia de la empresa.

- **Control Ambiental**

No es fácil la creación ni el mantenimiento de áreas asépticas, ya que aparte de mantenerse limpia a nuestros ojos, también debe ser libre de contaminantes microscópicos, que pueden ser viables y/o no viables.

Para asegurar las condiciones de asepsia requeridas, es necesario considerar los soportes técnicos y procedimientos adecuados. El diseño de las áreas asépticas requiere de especial atención a una variedad de parámetros ambientales, tales como la selección del sitio, planeación del área y espacio necesario para cada actividad, diseño y fases de construcción, flujo de los materiales y del personal, mantenimiento y operación de dichas áreas, así como para permitir la adecuada limpieza, operación eficiente y el confort del personal.

- **Control Microbiológico**

Uno de los aspectos de gran impacto e importancia es el referente al control Microbiológico, específicamente la producción de parenterales es afectada por una variedad de fuentes, de las cuales debe existir un seguimiento de las condiciones ambientales microbiológicas durante los procesos de fabricación, para garantizar el cumplimiento de límites previamente establecidos y en concordancia con la

clasificación internacional que para tal efecto se ha creado, en este caso particular las referentes al control microbiológico. Así como conocer la interacción hombre-microbiota, los métodos de identificación y los métodos de evaluación a un programa de control ambiental.

- **Revisión de Pruebas: Endotoxinas Bacterianas**

La realización de pruebas para determinación de agentes pirogénicos, es de gran importancia por el peligro que estos representan para la vida humana. Ya que la administración de un producto con este tipo de contaminación puede causar una variedad de respuestas fisiológicas incluyendo la muerte. Por ello se han desarrollado diferentes métodos para su detección. El método utilizado en Gist-brocades corresponde al denominado LAL (Lymulus Amebocyte Lysate), en su variedad de formación de gel. Este método en comparación al tradicional denominado Pirogénos es mucho más fácil de realizar y con posibilidad de realizar un gran número de pruebas a la par.



CAPITULO 1
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

CAPITULO I

- 1. ASEGURAMIENTO DE CALIDAD
 - 1.1 ANTECEDENTES

El aseguramiento de la calidad es la recopilación de las experiencias en el manejo de la calidad, que se ha normalizado internacionalmente y a su conjunto se le denomina **Aseguramiento de la Calidad**.

El concepto de aseguramiento no es similar al concepto de control, ya que controlar significa medir y evaluar; asegurar, en cambio, significa mantener en forma permanente una certificación formada por controles, con base en un modelo permanente, determinado por la existencia de los controles (Becerril A., 1999 pp2) .

El aseguramiento de la calidad surge en respuesta a las fallas en el equipo Militar de Estados Unidos, durante la Segunda Guerra Mundial, comenzando a utilizar procedimientos estadísticos de muestreos, y a establecer normas estrictas a los proveedores. Se creó una comisión la cual emitió la norma MIL-Q-9858 que recopila los puntos fuertes de cada compañía proveedora del ejercito en el manejo de la calidad.

A partir de 1975, se inician esfuerzos para adecuar el Aseguramiento a la industria en general, así nacen normas en Inglaterra y Canadá entre otras.

Es necesario conocer 2 documentos normativos que son básicos para el correcto desempeño de este sistema: Las GMP's y la norma ISO 9000.

1.1.1 GMP's o Good Manufacturing Practices (Buenas Practicas de Manufactura).

Este sistema de GMP's fue elaborado en los Estados Unidos por la agencia de salud: *Federal Drugs Administration* (FDA por sus siglas en Inglés) por medio del Código Federal de Regulaciones (CFR) y se encuentra en el Registro Federal por los departamentos ejecutivos y agencias del gobierno federal estadounidense. La cual esta dividida en 50 títulos y cada uno esta dividido en partes y subpartes. La parte aplicada a la industria farmacéutica es la 211, subpartes B a la K.

Este sistema es complementario a las Normas ISO, pues sólo es de aplicación estricta a los Estados Unidos de América, y como se verá más adelante las Normas ISO tienen más universalidad.

1.1.2 ISO (International Organization for Standardization).

Son una serie de estándares (conocidas en E.U.A. como series ANSI/ASQC Q90-Q94). Primariamente percibido para ayudar a armonizar un gran numero de estándares nacionales e internacionales, integrado por una delegación mundial conocida como ISO/Technical Committee 176, conformada por AFNOR (Association Francaise de Normalisation), ANSI (American National Standards Institute), BSI (British Standards Institute), NNI (Nederlands Normalisatie Instituut), y SCC (Standards Council of Canada), entre otros.

La serie ISO 9000 consiste de 5 documentos : tres documentos son básicos de los modelos de aseguramiento de la calidad: 9001, 9002, y 9003; y dos soportan documentos guías: 9000 y 9004. El título claramente indica su propósito.

ISO 9000.- ADMINISTRACION DE LA CALIDAD Y NORMAS DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. GUÍA PARA SELECCIÓN Y USO.

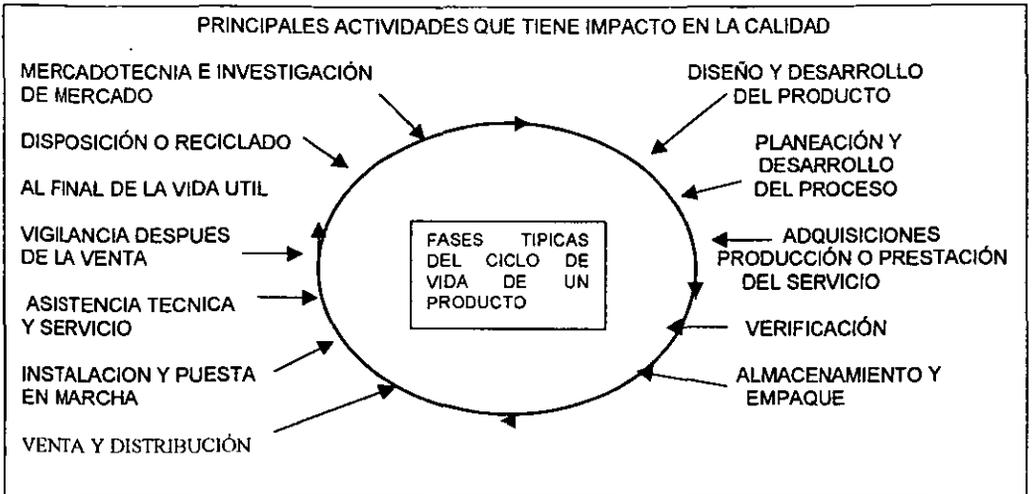
ISO 9001.- SISTEMA DE CALIDAD.- MODELO PARA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD EN DISEÑO, PRODUCCION, INSTALACION Y SERVICIO.

ISO 9002.- SISTEMA DE CALIDAD.- MODELO PARA EL ASEGURAMIENTO DE CALIDAD APLICABLE A LA FABRICACIÓN E INSTALACION.

ISO 9003.- SISTEMAS DE CALIDAD.- MODELO PARA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD EN INSPECCIÓN FINAL Y PRUEBA.

ISO 9004.- ADMINISTRACION DE LA CALIDAD Y ELEMENTOS DE LOS SISTEMAS DE CALIDAD-GUÍAS.

El objetivo de estas normas es ser adoptadas normalmente en su forma actual, pero en ocasiones podrán necesitar ser adaptadas a situaciones contractuales específicas. La norma ISO 9000 proporciona una guía para dichas adaptaciones así como una selección del modelo de seguridad de calidad apropiado (Lamprecht L..J., 1992 pp1-4).



1.1.3 Construcción del sistema de Aseguramiento de la Calidad en GIST-BROCADES.

A) Primera etapa.

A inicios de 1997, se empezó con una serie de cursos enfocados a dar a conocer por primera vez al personal que no lo conocía, y reforzar a quienes ya lo conocían, una serie de lineamientos implementados por el Gobierno de E.U.A., para garantizar mediante la aplicación adecuada de él, el correcto cumplimiento de la calidad que nuestros productos deben tener, este sistema es Buenas Prácticas de Manufactura o GMP's por sus siglas en inglés.

Este sistema tiene como meta la calidad de los productos fabricados en todos los departamentos, es decir, se tiene un esfuerzo global de calidad por parte de todos los que laboran en la empresa.

En el laboratorio de control la implementación de este sistema sirvió para:

Fundamentar y garantizar la operación de las actividades con procedimientos escritos, aprobados y vigentes seguidos de manera estricta, de lo cual cualquier desviación sería investigada y documentada para prevenir recurrencias.

B) Segunda etapa

Posteriormente ingreso a la empresa la Q.F.B. Graciela Aguilar Gil Samaniego en el Puesto de Dirección de Calidad, dando arranque a la segunda etapa del proceso, la implementación del Sistema de Aseguramiento de la Calidad conocido como ISO 9002 y su interrelación hacia las GMP's, para formar un acoplamiento de ambas Normas, pues estas no son excluyentes una de la otra, sino que se complementan.

ISO 9002 es un estándar internacional relacionado con requerimientos de Sistema de Calidad, es un módulo para el **aseguramiento de la calidad en producción, instalación y servicio**, es decir, esta norma es aplicable en las situaciones contractuales en las cuales:

- a) los requisitos especificados para el producto estén dados en términos de un diseño o especificación establecido.
- b) La confianza en la conformidad del producto puede lograrse mediante una demostración adecuada de la capacidad de cierto proveedor en la producción y en la instalación.

Este estándar es complementario y no alternativo de los requerimientos técnicos especificados del producto.

Es importante reconocer la disposición que tuvo la Dirección General de la empresa para iniciar este Proyecto, esta recae sobre la Lic. Gabriela Rodríguez.

1.2 SISTEMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD.

La implantación del Sistema de Calidad tiene la ventaja de proporcionar los fundamentos para controlar y mantener los procesos en cualquier campo de actividad, generando el cumplimiento de las necesidades y expectativas del cliente, alcanzando la competitividad en el mercado mundial.

Para comprender mejor lo que es el sistema de aseguramiento de calidad es necesario recurrir a algunas definiciones:

- **CALIDAD:** conjunto de características de un elemento que le confiere la aptitud para satisfacer necesidades explícitas e implícitas.
- **SISTEMA:** conjunto de elementos interrelacionados y estructurados que persiguen un mismo objetivo.

- **SISTEMA DE CALIDAD:** conjunto de elementos interrelacionados y definidos que buscan de manera sistemática y con la participación organizada de todos los miembros de la empresa, elevar consistente e integralmente la calidad de sus procesos, productos y servicios, previniendo el error y haciendo un hábito de la mejora continua con el propósito central de satisfacer las necesidades y expectativas del cliente.
- **ADMINISTRACIÓN DE LA CALIDAD:** conjunto de actividades de la función general de administración, que determina la política de calidad, los objetivos, las responsabilidades, y la implantación de éstos por medios tales como planeación de la calidad, el control de calidad, aseguramiento de la calidad y el mejoramiento de calidad dentro del marco del sistema de calidad.
- **ADMINISTRACION PARA LA CALIDAD TOTAL:** conjunto de actividades que busca de manera sistemática y con la participación de todos los miembros de una empresa o de una organización, elevar consistente e integralmente la calidad de sus procesos, productos y servicios, previniendo el error y haciendo un hábito de la mejora continua con el propósito central de satisfacer las necesidades y expectativas del cliente.

(NMX-CC-001: 1995 IMNC [ISO-8402:1994] ADMINISTRACIÓN DE LA CALIDAD Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD. VOCABULARIO)

1.3 REQUISITOS DEL SISTEMA DE CALIDAD

La óptima función del sistema de calidad necesita básicamente de un sólo requisito, enfocado al cumplimiento de objetivos concretos, este requisito es:

El compromiso de la Dirección Administrativa de la Empresa.

La Dirección Administrativa es la que adquiere el compromiso y la responsabilidad de dirigir la compañía estableciendo que es lo que persigue, en el presente y en el futuro, los mecanismos de organización, compromiso y seguimiento para lograr el cumplimiento de las metas, definidas mediante actividades; definir a los responsables y fechas compromiso, además de su evaluación periódica (Tabla G., 1998. Pp XV).

1.3.1 Responsabilidades de la Dirección Administrativa de la empresa.

Las responsabilidades de la dirección son:

Definir la política de calidad, la organización para la calidad y la revisión del sistema de calidad por la dirección.

La implantación de la norma requiere definir una serie de pasos para establecer la razón de ser de la empresa, y debe tener las siguientes características:

- La empresa tiene el objetivo de cumplir con los requisitos de los clientes tanto internos como externos. -
- El dinamismo necesario para lograr la actualización de los requisitos en la empresa, así como su traslado a la capacidades y habilidades de su infraestructura y del personal para llevarlos cabo.
- Tener el liderazgo por parte de la dirección de la empresa para provocar que se realicen las actividades que fueron planeadas y lograr los objetivos.

1.3.2 Política de Calidad.

En los requerimientos generales, uno de los compromisos de la Dirección es la Política de Calidad, la cual debe ser definida, documentada, mostrar los objetivos para la calidad, ser congruente con las metas de la organización y las necesidades de los clientes, y además asegurarse que es entendida, implantada y mantenida en Todos los niveles de la organización.

La política de calidad de Gist-brocades IPM es la siguiente:

- Fabricar nuestros productos dentro de un sistema de calidad que cumpla con los requerimientos de las Buenas Practicas de Manufactura (GMP's) y la norma ISO 9002.
- Nuestro compromiso es lograr la satisfacción total de los requerimientos acordados con nuestros clientes.
- Todos los que trabajamos en Gist-brocades IPM, nos comprometemos con un proceso de mejora continua, trabajando en equipo y agregando valor a nuestras actividades.

1.3.3 Organización para la Calidad.

Esta organización es establecer las responsabilidades y autoridad en la organización, definiendo con documentos que establezcan la autoridad, responsabilidad y relaciones operativas y administrativas necesarias para gestionar, ejecutar y controlar las actividades para realizarse con calidad.

Para establecer los conceptos de responsabilidad y autoridad, es necesario conocer los objetivos de tarea y los de valor agregado, es decir los de tarea son aquellos descritos en la descripción del puesto, y los de valor agregado son aquellos realizados como una contribución al resultado de su empresa (propuesta personal a la mejora).

La organización también involucra la reducción de niveles jerárquicos, lo cual provoca se requiera tomar decisiones para optimizar la capacitación al personal, con el fin de que éste realice actividades distintas para lograr ser más competitivo.

La organización también involucra definir y establecer los recursos para el sistema de calidad (ANEXO I ORGANIGRAMA).

1.3.4 Recursos para el Sistema de la Calidad.

Este apartado indica la necesidad de identificar y proveer los recursos necesarios para sugerir la calidad de los productos y servicios; uno de los recursos es realizar las auditorias al sistema, al proceso, y al producto y a los proveedores con personal capacitado para utilizar la información resultante como mecanismo de retroalimentación y de planificación para implantar el sistema.

1.3.5 Representante de la Dirección para la Administración del Sistema de la Calidad.

La dirección general estableció las responsabilidades y autoridad, señalando los recursos y el personal para verificación, estableciendo de manera explícita quién es la persona líder para la implantación del sistema de calidad. En este caso la Dirección de Calidad decidió crear el Departamento de Sistema de Calidad, cuyo responsable directo fue el IBQ Tomás González, Gerente del Sistema de Calidad, y como coordinador a la Q.F.B. Ma.Eugenia Gómez, posteriormente se incorporó la Q.F.B. Lucia Romero Nazar en lugar de la primera; este equipo de trabajo se encargo de las

auditorías a todas las operaciones de la planta (en todos los departamentos: control de calidad, aseguramiento de calidad, producción, mantenimiento, almacenes, compras, logística, finanzas), pero las auditorías al sistema de calidad fueron realizadas por personal ajeno a dicha área, previa capacitación, estas personas fueron Lic. Patricia Gómez de Relaciones Industriales y el Sr. Jaime Pérez Jefe de Almacenes.

Esto no quiere decir que la responsabilidad se haya delegado únicamente y exclusivamente al departamento de Sistema de Calidad, sino que los departamentos tuvieron sus propias responsabilidades, siendo dirigidos por el sistema de calidad para la correcta implantación del sistema, y posteriormente el fortalecimiento del mismo, teniendo como obligación el reportar a la dirección el avance del proceso para su revisión en periodos preestablecidos, así como el servir de enlace entre la empresa y las demás entidades externas que requieren intervenir para la implantación de sistema.

1.3.6 Revisión del Sistema de la calidad por la Dirección.

La dirección de la empresa debe conocer el grado de avance para asegurar la continuidad y efectividad de la implantación de la norma, en la cual su herramienta de trabajo es la documentación de reportes en los avances, problemas y necesidades de apoyo para lograr el objetivo de implantar el sistema de aseguramiento de la calidad.

El ejemplo más claro son las llamadas autoauditorías, y las reuniones posteriores a las auditorías para realizar la revisión donde participan los altos ejecutivos de la empresa.

1.4 DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE CALIDAD

El mecanismo para establecer el sistema de calidad es la documentación de cada una de las etapas de trabajo en la empresa mediante la descripción de cómo se cumplen los requisitos. Para lograrlo, se requiere establecer quién será el responsable del desarrollo e implantación de los manuales, procedimientos, instructivos técnicos, o administrativos y de anotar en los registros que son indispensable para cumplir con la razón de ser de la empresa.

Los documentos y los niveles en los que se deben elaborar e implantar van de la siguiente manera:

- ❖ Nivel Directivo: Manual de calidad, en el que se definen la política y los objetivos de calidad para cada requisito de la norma.

- ❖ Nivel departamental: son los procedimientos generales, determinan los sistemas organizativos interdepartamentales con sus respectivas responsabilidades.
- ❖ Nivel operativo: instrucciones de trabajo, en las que se detallan las instrucciones técnicas para realizar las tareas concretas tanto operativas como administrativas y los registros de calidad, dan la información para evidenciar la aplicación del sistema.

El mecanismo para establecer el sistema de calidad, es la documentación de cada una de las etapas de trabajo en la empresa mediante la descripción de cómo se cumplen los requisitos.

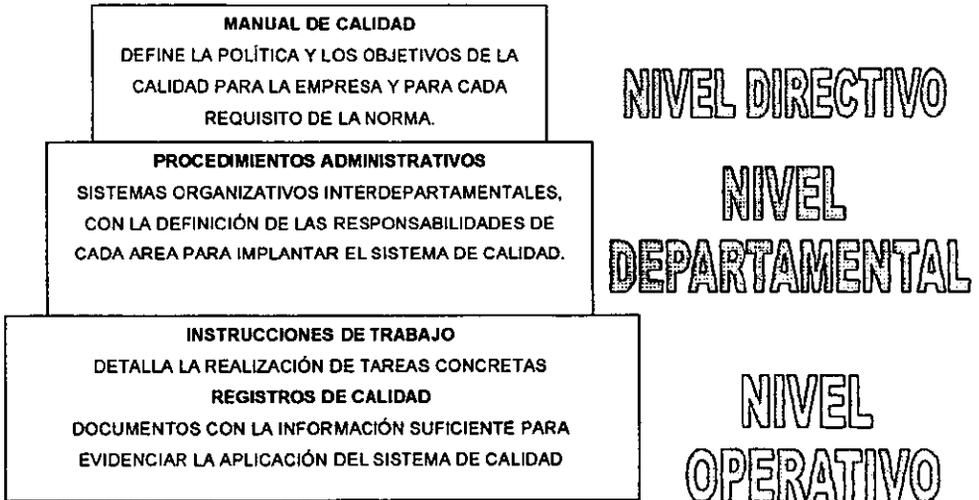


FIG.2 NIVELES DE DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE CALIDAD.

Todo lo anterior se maneja por la alta gerencia, nuestra participación como Químicos Analistas, fue la implementación y renovación de los procedimientos necesarios para describir nuestras actividades y dejarlas establecidas en los Procedimientos Estándar de Operación, con la supervisión y revisión de los jefes de departamento, buscando el soporte teórico y el cumplimiento con la Normatividades vigentes en nuestra áreas de operación (NOM, CFR, GMP's, ISO).

En resumen lo que se pretende con el sistema de calidad, es obtener medicamentos que satisfagan sus características de diseño, y por lo tanto sean adecuadas para su uso. Consultar anexo II NORMA ISO 9002 y ANEXO III GMP's.

Es importante comentar, desde el inicio de los primeros programas del sistema de calidad, este se fue auditando, para conocer el grado de avance con respecto al cumplimiento de la norma, y descubrir áreas de oportunidad, evitando que el sistema fuese debilitado. Después de un periodo de preparación, se realizó la auditoria para obtener la certificación en ISO 9002, la cual se obtuvo por parte de la Société Générale de Surveillance de México (SGS), encargada de hacer las auditorías y evaluación correspondientes para otorgar dicho reconocimiento, con vigencia de 17/12/1998 – 31/01/2002.

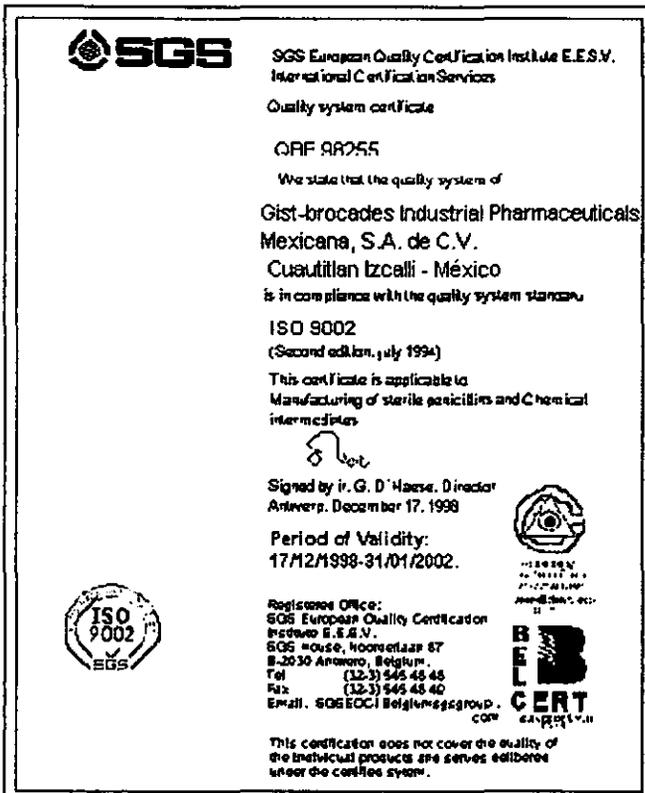


FIG. 3 CERTIFICADO ISO 9002

1.5 SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN ISO 14001

El éxito del sistema de Aseguramiento de Calidad dio la pauta para pensar en buscar la Certificación en ISO 14001 (norma hecha para el cuidado del medio ambiente), dando inicio formalmente el proceso de preparación en Enero de 1999, estableciendo todo lo necesario para construir el Sistema de Administración en Seguridad, Salud y Ambiente, el cual empezó a trabajar emitiendo e implantado las bases a inicios del mes de Marzo de 1999. Este proyecto corrió a cargo de la Dirección General a través de la Gerencia del departamento de Control Ambiental, Seguridad e Higiene, cuyo titular es el Ing. Agustín López, y colaboradores directos al Ing. Enrique Barquera y Lic. Janeth Sánchez.

El sistema ISO 14001 es una normatividad internacional relacionada al cuidado del ambiente, cuyo estándar fue publicado en 1996 a nivel Internacional, en México esta norma se emitió con el nombre de NMX-SSA-001-1998-MNC. En este se plantea un Sistema de Administración Ambiental, en base a políticas y habilidades del personal de las empresas, otorga prioridades a los distintos riesgos ambientales, establece objetivos, cumple con las normas legales, previene la contaminación y se integra con otros procesos de mejora continua. Nuestra participación en este sistema fue la detección de los aspectos (elementos de las actividades, productos o servicios de una organización que puede interactuar con el ambiente) y los impactos (cualquier cambio en el ambiente, ya sea adverso o benéfico, que resulte total o parcialmente de las actividades, productos o servicios de una organización), es decir las causas y las consecuencias.

El cumplimiento de las normas ambientales es un benéfico directo al lugar donde vivimos, respecto a la vida, a la conservación de los recursos naturales, a la conciencia ecológica, a la mentalidad del reciclaje, a nuestra propia salud y seguridad, y este compromiso es tanto de nosotros por la disminución de los impactos generados por nuestra actividades diarias, como de nuestros proveedores y contratistas. Además a nivel de Empresarial contribuye a la disminución de multas, a tener una imagen verde dentro de la comunidad, disminución de desperdicios, y una parte importante a generar empleos por cumplimiento de nuevos requisitos de mercado.

1.5.1 Política Ambiental.

La política ambiental es una parte importante del sistema, pues nos indica los objetivos de la empresa, en nuestro caso la política implantada es la siguiente :

DSM Anti-infectives México Gist-brocades IPM, ubicada en Cuautitlan México y dedicada a la fabricación de productos beta-lactámicos e intermedios químicos para la industria farmacéutica, tiene como política ambiental, prevenir y reducir el impacto generado por nuestras actividades (incluyendo proveedores y contratistas), procesos y productos, por lo que todos los que laboramos en esta empresa nos comprometemos con un proceso de mejora continua a:

- Crear conciencia en el personal para lograr el consumo eficiente de recursos naturales como papel, electricidad y agua
- Disminuir el impacto generado al agua, aire y suelo.
- Promover la reutilización o reciclaje de los residuos generados.
- Prevenir los riesgos ambientales asociados a la actividad de transportación de nuestras materias primas peligrosas.
- Minimizar las molestias causadas al personal y a la comunidad por las operaciones diarias de la planta.
- Cumplir con las normas oficiales mexicanas en materia ambiental.

El sistema de Administración Ambiental obtuvo su recompensa al lograr la Certificación en ISO 14001 en Enero del 2000 por SGS European Quality Certification Institute E.E.S.V.

Todo lo anterior es a grandes rasgos mi perspectiva (basado en bibliografía) de la implantación del Sistema de Calidad y el sistema de Administración Ambiental, faltan muchas cosas por considerar y prueba de ello es la existencia numerosa bibliografía para describir como se hace la implantación de ambos sistemas.

Mi propósito es dar a conocer que cualquier actividad que se realice, debe estar fundamentada o soportada por diversas Normatividades tanto nacionales como extranjeras, y que la implantación de sistemas como las GMP's así como ISO 9002 e 14001, son muy importantes como una forma de trabajar, pues siempre se pretende trabajar de menos a más para darle a nuestras actividades ese valor agregado que repercutirá en fabricar productos con calidad y satisfacer las necesidades de nuestros clientes.

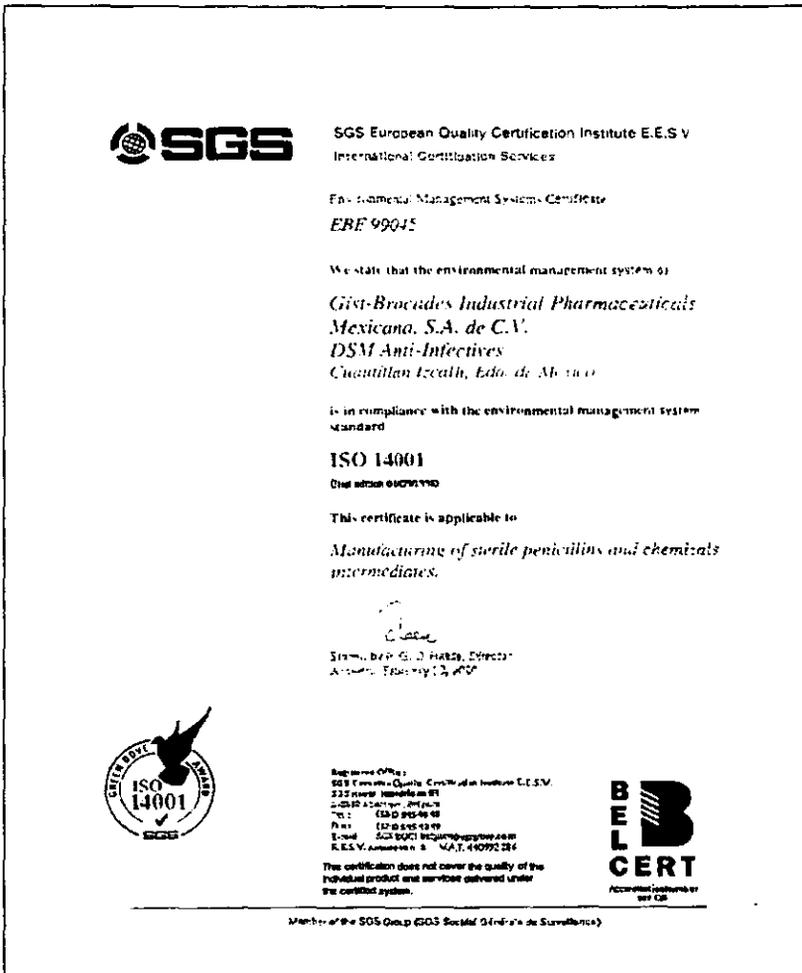


FIG. 4 CERTIFICADO ISO 14001



CAPITULO 2
CONTROL AMBIENTAL

CAPITULO 2

• 2. CONTROL AMBIENTAL

2.1 ANTECEDENTES

El cuarto limpio es parte integral del bloque para la preparación de productos estériles y puede definirse como una zona delimitada por paredes, techo, piso y accesos, en la cual se desarrolla un sistema muy complejo de barreras, áreas críticas, control de tráfico y control ambiental, para tener estricto control sobre la cantidad de material particulado (microbiológico o no) presente, así como de parámetros tales como temperatura, humedad relativa y sobrepresión, requeridos para la adecuada operación del área (GUIA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA PARA CUARTOS LIMPIOS; 1989) (Carleton and Agalloco; [De VECCHI], 1986).

El diseño de instalaciones de uso parenteral requiere de mucho cuidado en la variedad de parámetros ambientales, tales como el sitio de selección de la construcción, planos de área, planos de espacio, características de diseño y construcción, flujo de personal y servicios (Lacchman, and Lieberman, [Keller A], 1984).

Existen un sin número de trabajos y guías para dirigir la construcción de Áreas Limpias, por lo que no es el objetivo describir una actividad de la cual no fui participe, para más información sobre lo anterior sugiero consultar las guías del Cipam para cuartos limpios, la NOM-059-SSA1, así como otras publicaciones; por ende sólo enfocare este trabajo a las actividades desempeñadas por mí diariamente.

La revisión de la NOM-059-SSA1, nos da idea de las condiciones que se necesitan para trabajar en un área para preparaciones estériles, como es el caso del Cap. 12, art. 12.1.2 que nos indica:

La producción de preparaciones estériles, debe llevarse en áreas limpias y el ingreso a estas de personal y/o materiales y equipo debe hacerse de acuerdo a PEO's que garanticen que su introducción no le afecte su condición de área limpia, estas áreas deben mantenerse con altos estándares de limpieza y con su suministro de aire filtrado de calidad apropiada.

2.2 CONDICIONES AMBIENTALES

Se consideran las condiciones del área de trabajo en condiciones normales de operación, donde se tienen que tomar en cuenta los siguientes parámetros:

HUMEDAD, TEMPERATURA, ILUMINACIÓN Y LA CLASIFICACIÓN DE AIRE.

(GUÍA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA PARA CUARTOS LIMPIOS; 1989) (Carleton and Agalloco; [De VECCHI]; 1986).

2.2.1 Humedad relativa:

Estará entre 40-50% y podrá variar de acuerdo con los requerimientos del proceso.

2.2.2 Temperatura:

Se considera la más adecuada entre 20-22 ° Centígrados para el confort del operario, sin embargo, ésta podrá variar de acuerdo a los requerimientos del proceso.

2.2.3 Iluminación:

La iluminación general debe ser tal que los operarios puedan trabajar con comodidad.

2.2.4 Clase de aire:

La clase de aire que debe mantenerse en el área depende del proceso que se realice, y para este fin la NOM 059 (Cap. 12) en su párrafo 12.1.4 dice:

Las áreas limpias para la fabricación de productos estériles, deben ser clasificadas de acuerdo a las características requeridas de aire en clase 100 (BLANCA BAJO FLUJO LAMINAR), Clase 10, 000 (BLANCA, FUERA DE FLUJO LAMINAR) y clase 100,000 (GRIS CLARO), según se indica en la tabla 1.

La clase de aire recomendada para Cuarto Limpio es 100 a 10 000 sin personal ni equipo en movimiento.

Dentro del cuarto limpio existe la siguiente clasificación:

- A) Zona Crítica. Es aquella en la que están expuestos el producto, los contenedores y el material de empaque primario. Para este se necesita aire clase 100 y flujo laminar.
- B) Zonas Generales o Adyacentes al área crítica. Son las áreas dentro del Cuarto Limpio anexas a las áreas críticas. Donde se necesita un aire clase 1 000 ó 10 000.

**TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE NIVELES DE AIRE LIMPIO EN ÁREAS ASÉPTICAS
PARA LA FABRICACIÓN DE PRODUCTOS ESTERILES**

CLASIFICACIÓN	<0.5 um.	<5.0um	UFC POR M ³
CLASE 100	3530*	CERO	< 3
CLASE 1000	35300*	247*	—
CLASE 10000	353000*	2470*	< 20
CLASE 100000	3530000*	24700*	< 100

*NUMERO MAXIMO DE PARTICULAS PERMITIDAS POR M³

La tabla de clasificación completa del Standard 209E se encuentra en el anexo IV.

Para alcanzar la clase 100 o menor, se recomienda el empleo de Módulos de Flujo Laminar Vertical o Campanas de Flujo Laminar Horizontal o Vertical, según la naturaleza del proceso.

Aquí es importante definir el término: Flujo Laminar.

Uno de los grandes avances para asegurar las condiciones de operación en ambientes extremadamente limpios (Clase 100), fue logrado por el descubrimiento de Whitfield en 1961 del concepto de Flujo Laminar. Este concepto implica proveer una masa continua de aire limpio a los productos y contenedores. Esta masa esta continuamente moviéndose en la misma dirección, desplazando los contaminantes liberados durante el proceso de manufactura permitiendo así la eliminación de estos de los ambientes críticos (Carteton and Agalloco; [De VECCHI],1986).

De lo cual se desprende el empleo de los denominados Filtros HEPA (High Efficient Particulate Air), los cuales son los encargados de filtrar el aire con una alta eficiencia de retención de partículas, en donde son requeridos una serie de cumplimientos en ciertos aspectos de funcionalidad, para garantizar una buena operación, y cuyo mayor uso esta relacionado a la industria Farmacéutica.

En general la Eficiencia de filtros esta definida como una capacidad del filtro a retener un cierto porcentaje de partículas de cierto alcance, aunque, en los filtros de alta eficiencia, el porcentaje pasa a través del filtro (penetración) y es usado como medición.

2.3. FILTROS HEPA.

Los filtros HEPA son filtros de alta eficiencia capaz de retener partículas tan pequeñas como 0.3 micras. Este tipo de filtro esta compuesto de fibras de vidrio extremadamente finas (0.1 micras). Ese medio de vidrio superfino prevé diferentes formas de filtración al filtro HEPA. La retención de partículas pequeñas se logra por la Difusión Browniana, de partículas intermedias por la intercepción o efecto inercial (impactación contra la fibra por medio de un súbito cambio en la dirección del aire) y también por el efecto de tamizado, la más elemental forma de filtración de aire (FUNDAMENTALS OF A MICROBIOLOGICAL ENVIROMENTAL MONITORING PROGRAM, 1990, pp S3-S16).

El rango de velocidad de filtración es de 5-12 fpm (1.524 a 3.6576 m/s), y un rango de temperatura entre 0 a 750 °F (-17° a 398 °C). Los separadores que tienen, sirven en forma primaria para dar espacio entre filtro y filtro y permitir a libre paso de aire, y en segundo lugar proveer direccionalidad al flujo. El material de separación es principalmente de aluminio y plástico.

El sistema de filtración de aire utiliza diferentes combinaciones acorde con el área a la cual se va a utilizar, la empresa tiene por costumbre utilizar un sistema de prefiltración, el cual consiste de un juego prefiltros, una bolsa de prefiltración de filtros y posteriormente el filtro HEPA. El cual nos va dando el grado de filtración desde partículas de polvo muy grandes (cm) hasta del tamaño de micras, con el fin de no obstruir los poros del filtro HEPA y por ende aumentar su vida útil.

2.3.1 Pruebas de eficiencia de filtros.

Una vez colocados los filtros se requiere conocer de una serie de parámetros para evaluar que el filtro esta colocado adecuadamente, y que funciona adecuadamente, las pruebas realizadas por la unidad de Aseguramiento de calidad son:

- ❖ Prueba de conteo de Partículas.
- ❖ Prueba de Flujo de Aire y Uniformidad.
- ❖ . Prueba de Integridad.
- ❖ Pruebas de control microbiológico

(Carleton and Agalloco, [De VECCHI], 1986).

Las pruebas de integridad de filtros y conteo de partículas eran realizadas por el departamento de Calibración de la unidad de aseguramiento de la calidad, el control microbiológico es la actividad que nosotros realizábamos.

2.3.2 Prueba de Integridad de Filtros.

El propósito es asegurar que el filtro HEPA no tenga fallas debido al daño durante la instalación u operación.

Esta prueba consiste en generar un aerosol del cual se conoce su tamaño de partícula, hacerlo pasar por el filtro HEPA mediante el propio flujo del sistema, y con un equipo lector (Fotómetro de capacidad conocida) realizar la lectura. Este se realiza alrededor de la periferia del filtro, también a lo largo y ancho del mismo. La prueba se realiza con Emery 3004 (DOP en desuso por sus propiedades cancerígenas).

Se considera como fuga cuando existe presencia de Emery 3004 en un concentración mayor al 0.03%.

En caso de fugas existe la posibilidad de sellar este punto con silicona (DOW o 3M adhesivo, etc.), pero la cara del filtro sólo permite tener cubierta en un máximo de su superficie de un 5% del total del área de dicho filtro (Carleton and Agalloco; [De VECCHI;], 1986)

2.3.3 Prueba de Uniformidad

Esta prueba es para verificar la horizontalidad y/o verticalidad del flujo de aire en un punto limpio de aire alcanzando un obstáculo o superficie, arriba de 40 pulgadas (101.6 cm) del piso. Esta determinación era realizada por compañía externa, y consiste en corroborar la dirección uniforme del flujo de aire. A grosso modo puede representarse al generar un sistema de gases visible, y revisar el comportamiento direccional que toma.

El comportamiento del aire puede realizarse de dos formas; la primera es caracterizada por un flujo liso, libre de cualquier disturbio tales como pequeños y temporales vórtices o remolinos, este es conocido como Flujo Laminar. El otro tipo de flujo es caracterizado por pequeños y temporales fluctuaciones causadas por inestabilidad. La velocidad de flujo no es constante pero más o menos fluctúa en un valor promedio. Este es conocido como flujo turbulento y los disturbios son frecuentemente interpretados como, remolinos temporales.

La importancia de estimar los problemas asociados con el transporte de contaminantes por aire, es comprender como estos ocurren. En situaciones reales los sistemas aerodinámicos que gobiernan la dispersión de contaminantes es siempre muy complicada, por lo que deben mapearse empíricamente estos comportamientos. Además la presencia de operadores incrementa el riesgo de contaminación, por lo que es importante prevenir en lo posible la formación de vórtices en este tipo de áreas (LJUNGQVIST B. AND REINMÜLLER B., 1993. Pp 60-69).

2.3.4 Prueba de conteo de partículas

Esta encaminada a establecer en que lugar de la clasificación del Federal Standard 209E, se encuentran las áreas de trabajo, es decir, el conteo de menos de 100 partículas por pie cúbico de aire, de 0.5 micras de diámetro o mas grandes, el cual se mantienen en el sistema.

El equipo es un contador de partículas Light-scatering.

Se realiza después de la verificación de que filtro HEPA no presenta daño y se presenta una velocidad de flujo adecuada.

Como indica la NOM 059-SSA1, en el Cap. 12, párrafo 12.1.5 dice:

La clasificación de las áreas debe realizarse en condiciones estáticas, dado que en condiciones dinámicas, no siempre se cumple con los estándares de partículas de aire en el punto de llenado, debido a la generación de partículas del mismo producto.

El equipo cuenta las partículas mayores o iguales a 0.5 micras de diámetro y a una altura de 40 pulgadas (101.6 cm) sobre el piso en el centro del cuarto.

Si el conteo en el rango de 0.5 micras es menor a 50 por pie cúbico de aire, deben realizarse 4 conteos adicionales con un 50% de confianza.

El sistema de aire se considera validado cuando el resultado de tres corridas consecutivas muestren similitud de resultados. Además el conteo de partículas no exceda 100 partículas 0.5 micras de diámetro por metro cubico de aire.

La prueba que a continuación se describe forma parte de las actividades que se realizan por parte de nuestro departamento, en el área de Pruebas de Esterilidad que estaba bajo nuestra responsabilidad.

2.3.5 Prueba de flujo de aire

El propósito de la prueba es demostrar que el sistema de aire está balanceado y es capaz de mantener una presión positiva a los cuartos adyacentes, a una velocidad determinada.

A la letra la NOM 059 cap. 12 párrafo 12.3.1 dice:

Una una (Unidad Manejadora de Aire) debe ser capaz de mantener una presión de aire filtrado positiva en relación a los cuartos adyacentes, en todas las condiciones operacionales y fluir el aire adecuadamente de las áreas críticas a las menos críticas (presión en cascada). Los parámetros recomendados con respecto a la inyección de aire y a las presiones diferenciales son: Velocidad de aire promedio de 27 m/min. (0.45m/s) ±20% y una presión diferencial mínima de 0.05 cm de columna de agua (0.02 pulgadas de columna de agua), entre cuarto y cuarto aséptico y de 0.12 cm de columna de agua (0.05 pulgadas de columna de agua), entre cuarto aséptico y cuarto adyacente no aséptico, estos parámetros puede ser modificados para áreas de fabricación o manejo de materiales patogénicos, altamente tóxicos, radioactivos y virus o bacterias vivas.

Además se recomienda en la misma norma Cap. 12 párrafo 12.3.3 dice:

Un sistema de advertencia o alarma debe ser instalado para indicar fallas en la fuente de aire (caídas de presión). Un indicador de la diferencia de presión debe estar fijo entre las áreas donde esta sea importante. Los medidores de presión diferencial deben estar localizados de tal manera que el inspector tenga fácil acceso a ellos, asimismo, deben llevarse informes diarios de las medidas de presión diferencial.

La velocidad de flujo además nos debe servir para cumplir los recambios de aire por zona, la cual en la NOM 059 párrafo 12.1.7 dice:

El número de recambios de aire por hora debe ser mayor o igual a 20.

Aunque en otras referencias bibliográficas se presenta otros datos donde se indica el número de recambios de aires por hora según los requerimientos de las propias zonas.

En la tabla 2 se aprecia un intervalo más adecuado de recambios de aire por hora en las zonas donde es más adecuado tener un mínimo de contaminación.

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE CAMBIOS DE AIRE POR HORA.

CUARTO CLASE	TIPO DE VENTILACION	CAMBIOS DE AIRE POR HORA
A	flujo laminar	360-500
B	flujo laminar	360-500
C	Abast. Aire mezclado, turbulento	>20
D	Abast. Aire mezclado, turbulento	5 -20

Abast. = abastecimiento

La obtención de los recambios de aire por hora, se obtiene de una serie de pasos donde deben de tomarse en cuenta las velocidades de flujo, así como la superficie total que conforma el panel de flujos, y el volumen del cuarto limpio (ver anexo V).

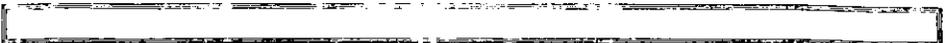
La medición se realiza con anemómetro calibrado con estándares primarios debidamente certificados, la calibración es realizada en forma externa. El departamento encargado de programar dichas revisiones es aseguramiento de calidad, por conducto del área de calibración. Existen varias compañías dedicadas a prestar estos servicios, ya que en ocasiones se realizan en el extranjero.

En el siguiente capítulo se analizará algunos aspectos interesantes del control microbiológico, que por su extensión es analizado en un capítulo independiente.



CAPITULO 3

CONTROL MICROBIOLÓGICO



CAPITULO 3

• 3. CONTROL MICROBIOLÓGICO

3.1 ANTECEDENTES

En la producción de fármacos es necesario tener extremo cuidado, siguiendo los principios normativos de las GMP's, independientemente si los productos van a ser estériles o no. La principal diferencia con los productos estériles estriba en la total ausencia de un tipo específico de contaminación. Esto es, tienen que estar libres de contaminación de organismos vivos (microorganismos) (Sharp J., 1992 pp 4-12).

Los estériles deben cumplir requisitos extras para asegurar la esterilidad, en pocas palabras, la fuentes potenciales de contaminación microbiológica en procesos asépticos son bien conocidas:

- PERSONAL
- EQUIPO
- AIRE
- AGUA
- PROCEDIMIENTOS INAPROPIADOS

Todo lo anterior puede ser controlado, no es fácil pero es factible y de hecho la fuente de contaminación más difícil de mantener bajo control es: **EL PERSONAL**.

❖ Equipo

La selección y preparación del equipo de manufactura es de importancia crítica en la operaciones asépticas, por lo que se enfatiza el uso de modernos equipos automatizados que han disminuido considerablemente la presencia humana. La implementación de severos regímenes de limpieza, La prevención de crecimiento microbiano sobre superficies, contar con PEO's y validaciones de los mismos en cuanto a limpieza y esterilización de insumos, especial atención en los procesos de filtración.

❖ Aire

Contar con un sistema de aire en apto funcionamiento para controlar volúmenes de flujo de aire y velocidad adecuada, patrones de flujo, conteo de partículas no viables, integridad y eficiencia de filtros, como se ha descrito en el capítulo anterior.

❖ Procedimientos

Cada operación debe ser controlada bajo diferentes niveles de seguridad. El procedimiento define como se hacen las cosas, debe describir completamente la actividad a realizar previa verificación. Ejemplos de estos son los relacionados a procesos de esterilización en homós, autoclaves, etc., esterilización por filtración, lavado de componentes y despirogenización, entre otros.

❖ Agua

La calidad de agua requerida en procesos donde se apliquen BPM's depende de la complejidad del proceso, en este caso es conveniente utilizar agua grado inyectable.

❖ El personal

El cual ha demostrado ser la fuente principal de contaminación como veremos más adelante (Wood T. R., 1996 pp 60-81).

3.2 TIPOS DE CONTAMINACIÓN

De manera general podemos clasificar las diferentes formas de contaminación en dos grupos principales:

- ◆ **NO VIABLES.** En estas hacemos referencia a contaminantes que son activos e inertes. En este caso, el tipo de contaminación es causada por diversas fuentes como polvo, tierra o cristales de otros lotes o residuos que pueden tener cierta actividad en el organismo al ser introducido a éste y se puede considerar como material particulado.
- ◆ **VIABLES.** Las formas viables de contaminación están conformadas por microorganismos, dentro de los cuales consideramos a Bacterias, Hongos, Levaduras y Virus; siendo los tres primeros de mayor interés para este trabajo.

3.2.1 Contaminación Microbiana.

Los microorganismos causantes de la contaminación de un medicamento puede ser dividido en 2 grupos mayoritarios acordes a sus estructura: Bacterias y Hongos. Los virus son algunas veces incluidos en la clasificación; sin embargo no son capaces de proliferar fuera de una célula viva, y por ende no son factibles de desarrollarse en un producto (en este caso en productos Betalactámicos); y las levaduras, las cuales siendo estrictos se consideran como hongos microscópicos formados por una sola célula (Wesley Volk A., 1996, pp 17).

En el grupo de microorganismos que son fuente de contaminación, las bacterias merecen un tratado aparte por la diversidad de enfermedades que originan tanto en humanos como en animales, además de ser las más encontradas en el monitoreo ambiental de Gist-brocades.

3.2.2 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares, presentan el tipo característico de célula procariota (membrana plasmática, no membrana nuclear, ADN es una fibra continua, presenta pared celular, ribosomas pequeños, ácido murámico), aunque en algunos casos pueden formar agregados y parecer multicelulares.

Para empezar el proceso de identificación, se requiere de una cantidad mínima de información, esta incluye:

- ❖ Tamaño, forma y disposición del microorganismo.
- ❖ Reacción de la tinción de Gram.
- ❖ Motilidad.
- ❖ Tamaño y aspecto de toda la colonia bacteriana.

Para determinar el primer punto es conveniente recordar que las bacterias, así como otros microorganismos no pueden ser observados a simple vista, ya que el tamaño de estos varía, en promedio se considera alrededor de 100 micras para hongos y protozoarios y hasta 1 micra en promedio para bacterias, y aun los virus tienen tamaños más pequeños alrededor de 100 nanómetros (Wesley A. Volk, 1996. Pp 34).

Por lo anterior es conveniente utilizar una serie de instrumentos denominados microscopios, los cuales nos ayudan a amplificar las imágenes para conocer ciertos detalles, de hecho el microscopio de laboratorio en el mejor de los casos nos ayuda a amplificar unas 1000 veces la imagen, suficiente para determinar tamaño, forma y su reacción a diferentes procesos de tinción.

3.2.2.1 Técnicas para el estudio Microscópico de las Bacterias.

Las bacterias vivas son difíciles de ver con el microscopio de luz normal debido a que la mayor parte de ellas son casi incoloras cuando se observan de manera individual, por lo que es necesario observarlas en preparaciones teñidas. Mediante la tinción de bacterias es factible conocer organismos que se colorean con una tintura química, de tal forma

que es más fácil observarlos y estudiarlos. En general, las muestra revelan tamaño, forma, disposición y en algunos casos estructuras internas.

REACCIONES DE TINCIÓN

Los colorantes son sales compuestas de un ion negativo y uno positivo, uno de los cuales se colorea (cromóforo). La afinidad de una bacteria por las tinciones alcalinas se debe principalmente a la gran cantidad de ácido nucleico de su citoplasma. Algunas colorantes alcalinas de uso más común son el cristal violeta, safranina y azul de metileno.

TECNICA DE TINCIÓN: TINCIÓN GRAM

Esta técnica es conocida así en honor al médico danés Hans Christian Joachim Gram, que en 1884 la desarrollo y probablemente es la más usada en Bacteriología. Es una tinción diferencial, ya que divide a las bacterias verdaderas en dos grupos fisiológicos, facilitando de gran manera la identificación el procedimiento de tinción tiene 4 etapas:

1. El frotis se cubre con violeta de genciana o cristal violeta.
2. Después de 60 segundos se lava la tintura de violeta y el frotis se sumerge en una solución de yodo.
3. 60 segundos más tarde se lava el yodo y la laminilla se decolora con alcohol etílico por 15 ó 30 segundos (también puede ser una mezcla 50:50 de acetona y alcohol etílico).
4. La laminilla se vuelve a teñir por otros 30 segundos con safranina (Tinción roja) o con café Bismarck (utilizado por personas que no ven el color rojo).

La tintura violeta y el yodo forman un agregado complejo. Algunos géneros se decoloran con facilidad al lavarlos con alcohol, a estos organismo se les denomina Gramnegativos, aquellos que retienen el complejo se conocen como Gram positivos. La siguiente tabla resume el aspecto de ambos tipos de células después de cada paso de la tinción.

TABLA 3. ASPECTO DURANTE EL PROCESO DE TINCIÓN GRAM

TINCIÓN GRAM		
BACTERIAS	G(+)	G(-)
Después del cristal violeta	Púrpura	Púrpura
Después del yodo	Púrpura	Púrpura
Después del lavado con alcohol	Púrpura	Incolora
Después de la safranina	Púrpura	Roja

Ahora se sabe que la diferencia de tinción se origina del efecto de que la pared celular de las bacterias gramnegativas son diferentes a las de las bacterias grampositivas; el complejo formado por el yodo y el colorante queda atrapado entre la gruesa pared celular y la membrana citoplásmica de los organismo grampositivos, en cambio, la eliminación de los lípidos de la pared celular gramnegativa, por medio del baño de alcohol, permite que el complejo yodo-colorante se deseche de la célula.

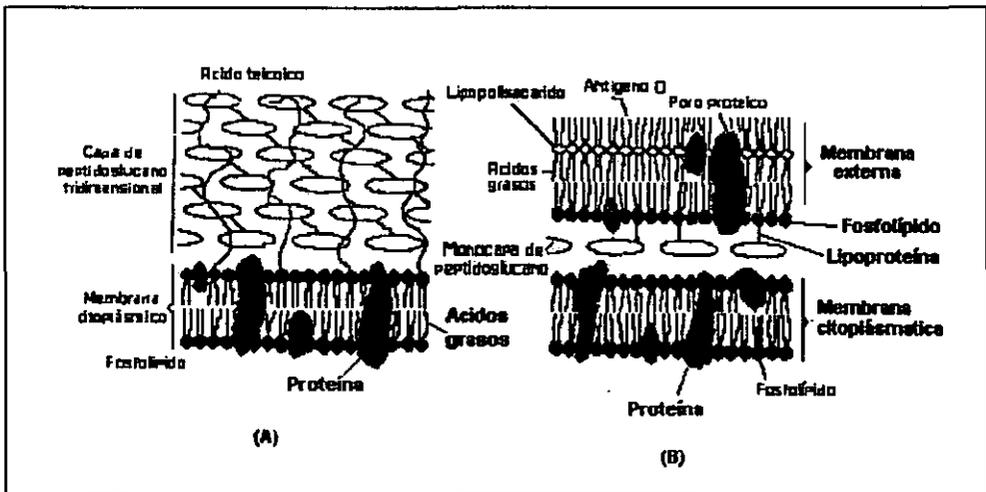


FIG. 5 PARED CELULAR A) GRAM POSITIVOS B) GRAM NEGATIVOS

En base a lo anterior las bacterias son subdivididas en dos clases: microorganismos Gram Negativos y microorganismos Gram Positivos. Los primeros suelen ser generalmente bacilos y no pertenecen principalmente a fuentes de origen humano (proviene de agua en su mayoría), mientras que los segundos son cocales y son

principalmente derivados de fuentes de origen humano, la tabla 4 muestra algunos ejemplos (Lacchman, and Lieberman, [Luna C]; 1984).

Es altamente recomendable la utilización de cultivos jóvenes para dicha tinción, pues en células viejas se pierde esta capacidad en grampositivos, lo que ocasionaría un error al interpretar el Gram.

TABLA 4. RESULTADO DEL GRAM EN BACTERIAS COMUNES

REACCIONES DE GRAM DE BACTERIAS COMUNES		
GRAMPOSITIVAS	GRAMNEGATIVAS	
Staphylococcus	Bacteroides	Neisseria
Streptococcus	Bordetella	Pseudomona
Micrococcus	Brucella	Salmonella
Listeria	Enterobacter	Shiguelia
Bacillus	Escherichia	Vibrio
Corynebacterium	Haemophilus	Yersinia
Clostridium	Klebsiella	

3.2.2.2 Fuentes de contaminación.

Los microorganismos provienen de diferentes fuentes, es decir, se encuentran en casi todas partes. Algunos sobreviven en presencia de ácidos fuertes, acuíferos de temperaturas elevadas y hasta en desinfectantes. Por lo que se encuentran en:

El ambiente que nos rodea, en el aire, en la tierra, en las paredes, pisos y superficies.

El agua, desde el agua potable, ríos, mares, océanos y lagos; charcos y superficies mojadas así como en pisos húmedos, etc., materias primas que se utilizan para fabricar los productos. Los envases y sellos que se utilizan en el empaque del producto.

3.2.2.3 Interacciones entre microorganismos y humanos..

Desde el nacimiento, los humanos están continuamente expuestos a microorganismos. Algunas interacciones entre poblaciones microbianas y humanos son esencialmente benéficas para ambos, pero otras provocan enfermedades.

Las interrelaciones tienen un grado de clasificación en términos ecológicos. Las relaciones benéficas entre poblaciones microbianas y anfitriones humanos son

señaladas como **sinérgicas**. Una relación es **comensal** cuando la población microbiana se beneficia sin afectar o beneficiar al anfitrión humano. **Parasitario** ocurre cuando la población microbiana se beneficia pero el anfitrión humano es afectado.

(Atlas R.M., 1988) (Isenberg D.H. and D'Amato F.R., 1991 pp 2-14).

Aunque nosotros no lo vemos, literalmente estamos cubiertos con microorganismos. De hecho, el promedio en un humano adulto de células animales eucariotas (células Humanas) es 10^{13} , y de 10^{14} correspondiente a células procaríotas y eucariotas de microorganismos (Atlas M.R, 1988, pp 537).

La superficie del cuerpo de la mayoría de los animales, incluyendo al humano, esta poblada de microorganismos, con distintas poblaciones microbianas habitando la superficie de tejidos de la piel, cavidad oral, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y tracto genitourinario. Las poblaciones microbianas más frecuentemente encontradas en asociación con tejidos particulares son remitidas como Poblaciones microbianas nativas, microflora normal o microbiota normal, prefiriéndose más el término microbiota.

MICROBIOTA NORMAL DE LA PIEL

A pesar de los diferentes mecanismos con cuenta la piel para no favorecer el crecimiento de microorganismos tales como: temperatura, rápida pérdida de agua, alta presión osmótica, ácidos grasos con acción antimicrobiana, entre otros, existe una microbiota residente. La población microbiana residente sobre la piel son las bacterias Grampositivas, que son relativamente más resistentes a la desecación en comparación con las Gramnegativas. Miembros del género *Staphylococcus* y *Micrococcus* son frecuentemente los más abundantes, ya que generalmente son tolerantes a la sal y pueden utilizar los lípidos presentes sobre la superficie de la piel.

Otras bacterias Gram positivas son *Corynebacterium*, *Brevibacterium* y *Propionibacterium*. Además de dos levaduras, *Pityrosporum ovale* y *P. orbiculare* normalmente crecen sobre el cuero cabelludo.

MICROBIOTA NORMAL DE LA CAVIDAD ORAL

En contraste con la relativamente pobre población en la piel, la cavidad oral desarrolla una abundante población de microorganismos, contiene una gran variedad de

superficies, con diferentes condiciones ambientales generando una variedad de hábitats para diversas poblaciones. Los Streptococcus típicamente constituyen una alta proporción de la microbiota, e inclusive algunas especies, incluyendo S. mutans, produce disminución de capas y factores de adherencia que permiten pegarse a la superficie del diente. Otras especies de Streptococcus, como S. sanguis, coloniza la saliva, algunas de estas bacterias ácido lácticas producen la placa dental en la superficie del diente formando la caries dental. Además existen Veillonella, Bacteroides, Fusobacterium, así como diferentes especies de Actinomyces, Neisseria, Treponema, Staphylococcus, Micrococcus, Vibrio, Leptotrichia y Rothia; hongos, tal como la levadura Cándida albicans, y protozoos, como Entamoeba y Trichomonas.

MICROBIOTA NORMAL DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Existe una marcada diferencia entre las porciones superior e inferior del tracto gastrointestinal con respecto a su habilidad para promover el crecimiento y sobrevivencia microbiana.

Aunque algunos microorganismos son capaces de reproducirse sin alimento en el estomago, los jugos gástricos excretados en el estomago matan muchos microorganismos. El bajo pH imposibilita la existencia de microbiota asociada a esta región del tracto. En la región inferior, en contraste ocurre todo lo contrario, pues existe una abundante microbiota a lo largo de todo el intestino y el colon. La temperatura constante, 37° C, y la disponibilidad de agua y nutrientes favorecen el crecimiento. La mayoría de los microorganismos en el intestino son anaerobios.

Durante la infancia prolifera el genero Bifidobacterium comparados a Lactobacillus. Posteriormente estos son desplazados en el adulto por otras especies, que incluye Lactobacillus, Streptococcus, Clostridium, Veillonella, Bacteroides, Fusobacterium, y bacterias coliformes. Las enterobacterias incluyen a Escherichia, Proteus, Klebsiella y Enterobacter, anaerobios facultativos.

MICROBIOTA NORMAL DEL TRACTO RESPIRATORIO

La microbiota normal del trato respiratorio es bastante diferente de la encontrada en el tracto gastrointestinal. Cada zona del tracto presente un mecanismo de defensa acorde a sus necesidades, tracto respiratorio superior (cavidad nasal y nasofaringe) es normalmente habitada por géneros de Streptococcus, Staphylococcus, Moraxella,

Neisseria, Haemophilus, Bacteroides y Fusobacterium, así como miembros de Spiroquetas y grupos Coryneiformes.

El tracto respiratorio inferior, sin embargo, carece de una microbiota normal, ya que cuenta con un sistema de células blancas previniendo así cualquier establecimiento de microbiota. Aunque puede ser colonizado temporalmente por microbios exógenos, que son inhalados en partículas de polvo o gotas.

MICROBIOTA NORMAL DEL TRACTO GENITOURINARIO

Semejante al tracto respiratorio bajo, el tracto genito urinario incluye al riñón y la vejiga urinaria, y se encuentra libre de microorganismos. La región externa de ambos sexos, sin embargo contiene varias poblaciones de microorganismos. Por ejemplo, la uretra tanto en hombres como en mujeres esta colonizada por bacterias. La microbiota normal del tracto vaginal incluye Streptococcus, Lactobacillus, Bacteroides y Clostridium; coliformes; Spiroquetas; levaduras, incluyendo a miembros del género Cándida; y protozoos flagelados del genero Trichomonas.

Aunque también crecen microorganismos ácido resistentes en la vagina, ya que presenta un pH entre 4.4 y 4.6., además debe tener presente que las fluctuaciones ocasionadas por el ciclo menstrual, también cambian el tipo de microbiota presente.

3.3 IDENTIFICACIÓN POR MEDIO DE SISTEMAS COMERCIALES

Existen el mercado una serie de sistemas de identificación para microorganismos, los cuales parten del empleo de reacciones bioquímicas. En nuestro caso particular utilizamos el Sistema BBL CRYSTAL de identificación, tanto para Bacterias Gramnegativas como para Bacterias Gram positivas. En ambos casos este producto es fabricado por Becton Dickinson Microbiology Systems.

Pero como se mencionó anteriormente, para llegar a la identificación preliminar es necesario haber realizado adecuadamente la reacción de Tinción Gram, pues de su resultado depende el empleo del panel de identificación para el microorganismo a examinar.

❖ Gram negativos utilizan:

Sistema para la identificación de patógenos entéricos/ no fermentadores. Este sistema para la identificación de patógenos entéricos/no fermentantes es un método de

identificación en miniatura, utiliza substratos cromógenos y convencionales modificados. Se ha diseñado para la identificación de bacterias aerobias Gram negativas de importancia clínica pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, así como algunas de las bacterias Gram negativas de origen humano, fermentadoras y no fermentadoras de glucosa más frecuentemente aisladas.

❖ Gram positivos utilizan:

Sistema para identificación de bacterias Gram positivas, y al igual que el anterior es un sistema de identificación en miniatura donde se utiliza substratos cromógenos y convencionales modificados.

En ambos casos cada sistema cuenta con su propio Método General de Análisis, donde se describe su metodología y las pruebas bioquímicas empleadas, teniendo algunas particularidades, pero básicamente la metodología es la misma en ambos casos.

3.3.1 Principios del procedimiento.

Los paneles del sistema BBL CRYSTAL ID contienen 30 substratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los substratos, se utiliza una suspensión bacteriana correspondiente al tubo No. 0.5 de Mac Farland . Las pruebas usadas en el sistema de identificación se basan en la utilización y degradación microbiana de substratos específicos detectados por sistemas indicadores. Los substratos cromógenos producen, como resultado de la hidrólisis, cambios de color que pueden observarse a simple vista. Además, hay otras pruebas que detectan la capacidad de un microorganismos de hidrolizar, degradar, reducir o de alguna manera utilizar un substrato en los sistemas BBL CRYSTAL ID.

Después de un período de incubación se examinan los pocillos para determinar el cambio de color debido al metabolismo del microorganismo, cada sistema trae una tarjeta con el código de colores indicando cuando es reacción negativa o positiva. Posteriormente se obtiene el código numérico resultante de las 30 reacciones, este es un número de perfil de diez dígitos, el cual se utiliza como base de la identificación, se capturan los datos en el sistema computarizado y este realiza una comparación con los diferentes perfiles de microorganismos que se encuentran almacenados en la memoria realizando una comparación de perfiles, una vez hecho lo anterior despliega los resultados de genero y especie que más se parezcan al perfil de una especie ya

conocida indicando el porcentaje de confianza y la validez de biotipo para ese microorganismo. De esta manera nos indica la probabilidad de que se trate de un microorganismo en particular, quedando a criterio del analista si la considera válida o no.

CALCULO DEL PERFIL PARA ID.

Cada reacción positiva recibe un valor 4, 2 ó 1, correspondiente al renglón donde se encuentre la reacción. Cada resultado negativo recibe un valor de cero. Los números resultantes de cada positivo en cada columna se suman, obteniendo de esta manera un número de 10 dígitos.

**TABLA 5. PERFIL BIOQUÍMICO DE IDENTIFICACIÓN
(CALCULO DEL NUMERO DE PERFIL BBL CRYSTAL)**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PERFIL	5	4	6	0	2	4	4	3	7	1

El número resultante y pruebas externas se capturan en el sistema, para obtener la identificación.

La precisión del sistema se basa en la interpretación estadística de pruebas específicamente diseñadas y una base de datos exclusiva. (Manual del sistema de identificación BBL Crystal, 1998)

En caso de falta de algunos de los paneles, o que el microorganismos de resultados poco confiables, se procede a la identificación por medio de pruebas independientes, es decir, usando el procedimiento general de identificación, que no es otra cosa que la recopilación de tablas, diagramas, etc., para llegar a la identificación del microorganismo en cuestión. Una de las referencias obligadas es el **Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington D.C.**, entre otros. Un ejemplo de identificación por la forma tradicional se puede ver en el anexo VI.

3.3.2 Identificación de hongos y levaduras.

Para la identificación de hongos y levaduras se cuenta con su procedimiento de identificación, que emplea la técnica de microcultivo (soportada en Agar Sabouraud), el cual después del tiempo de incubación, se observa al microscopio, y se busca semejanza del aspecto de las esporas sexuales, esporas asexuales y la conformación de toda la estructura del organismo con lo reportado en dibujos de morfología microscópica de hongos y algunas levaduras reportadas de literatura. El libro de trabajo que nosotros empleábamos es: **Larone, H.D., Medically Important Fungi, A guide to identification, 1987.**

Esto era suficiente, ya que la contaminación por hongos en áreas críticas era muy baja.

3.4 CONTROL DE LA CONTAMINACION: EL PERSONAL

En la fabricación de productos estériles, uno de los principales problemas es eliminar la presencia de microorganismos. Como se recordará en el capítulo anterior hicimos referencia a los cuartos limpios, los cuales por medio de diferentes mecanismos logramos mantener controlada ciertas fuentes de contaminación. Por otro lado también sabemos que el problema mayor y más difícil de contaminación es el causado por las personas; ya al inicio de este capítulo revisamos la microbiota que se encuentra normalmente en el hombre, ahora, lo que trataremos de explicar son los mecanismos que se tienen que realizar para controlar y reducir esta fuente de contaminación.

3.4.1 Entrenamiento del personal

Casi todo el personal induce accidentalmente contaminación, y esto se debe a la ignorancia del personal que no ha sido adecuadamente bien entrenado en técnicas asépticas o carece del cuidado necesario para realizar esta actividad. Por ende el aprender y aplicar técnicas asépticas no sólo requiere de habilidad física e intelectual, sino también involucra el desarrollo y persistencia de una buena actitud mental.

Las GMP's en la sección 211.25, contiene varias declaraciones incitando al compromiso del personal para entrenarse en los procesos de manufactura, proceso, empaque y envase de los productos. El personal debe comprender las GMP's y utilizar los PEO's en las actividades que realiza cotidianamente (Akers J.M., 1985. pp 58-61).

CARACTERÍSTICAS DEL EMPLEADO EN CUARTOS LIMPIOS.

El empleado debe estar sano y limpio. Su higiene personal debe estar bajo ciertos niveles. Se debe incluir una revisión visual de la condiciones generales físicas del cuerpo, para detectar posibles eczemas, heridas abiertas, etc., además de realizar un examen microbiológico para determinar su flora en la cavidad oral (exudado faringeo), así como un coprocultivo. Ambos exámenes son realizados antes de que se contrate a la persona, tanto para el puesto de operador como de analista y se realiza cada 6 meses, mientras trabaje en este tipo de áreas.

Toda persona con evidente enfermedad respiratoria debe ser separado de su actividad en el cuarto limpio, hasta su recuperación, reasignandoles otra actividad.

Las habilidades y actitudes que el personal debe tener para este tipo de actividades son:

a) Estudios mínimos de secundaria, b) buena destreza manual, c) buenos hábitos de trabajo y d) el comprender la importancia de las acciones que realiza.



Adicionalmente debe contar con:



- 1) un alto nivel de motivación, 2) orgullo de un trabajo bien hecho, 3) una buena aptitud al trabajo, 4) buena voluntad a asumir inconveniencias, 5) un interés en mantener la limpieza, 6) conocimiento, 7) dedicación a la calidad, 8) organización, 9) credibilidad, 10) alerta mental, 11) sentido de responsabilidad, 12) cuidadoso, 13) una aptitud positiva a operaciones repetitivas, 14) atento a los detalles, 15) puntual, 16) habilidad de escuchar, y 17) veraz .

3.4.2 Factores del control de la contaminación.

Factores como higiene personal, actividad personal, flujo de tráfico, vestimenta en cuartos limpios debe ser controlada para proteger la integridad y pureza del producto terminado. Otros puntos a considerar son la facilidad del diseño, sistemas de manejo de aire, y mantenimiento y limpieza de los cuartos limpios.

Un aspecto a considerar es el encontrado por diversos estudios, el **efecto del baño como fuente de dispersión bacteriana**, ya que al terminar éste se aumenta la dispersión de contaminantes en cientos de organismos que son removidos en este proceso, alcanzando su máximo pico entre los 30 a 45 minutos después del baño. Esto se explica ya que durante el baño se remueve el sebo de la superficie de la piel, este causa temporalmente la escamación de la piel por el secado, así como de los vellos. Por eso es altamente recomendable que antes del inicio de las actividades no se bañe el personal que ingresará a los cuartos limpios.

El uso de la ropa adecuada también es importante, ya que la fricción entre esta y la piel genera descamación, de ahí la importancia de escoger el uniforme adecuado a las actividades que se realizarán. En el mercado existen dos tipos de uniformes los de un filamento sintético llamado Dacron y el Tyvek.

Dacron es el nombre de una fibra textil de poliéster y Tyvek que es 100% fibra de polietileno de alta densidad. Este último tiene diferentes grados y es considerado el más efectivo que los uniformes tejidos (Lacchman, and Lieberman [Luna, C, pp 433-435] 1984.).

El tipo de uniforme utilizado en Gist-brocades son los denominados Tyvek y constan de:
Escafandra: cubre la cabeza a excepción de los ojos, y la parte de la espalda y el tórax.
Overol: cubre desde el zona donde termina el cuello, hasta la piernas (zona de los tobillos), además de cubrir los brazos (hasta las muñecas).
Zapatos.- cubren los pies y llegan hasta las rodillas.
Goggles y Guantes de hule.

Todo lo anterior debe estar completamente aséptico, y realizarse con el procedimiento adecuado de vestido para garantizar que no se ingresa contaminación al cuarto limpio. Pues en la piel de un adulto sano pueden desprenderse entre 2 a 6 millones de Unidades Formadoras de Colonias en media hora de actividad vigorosa.

Especie: Homo contaminatus

Vestimenta: 99% Reducción de
Partículas

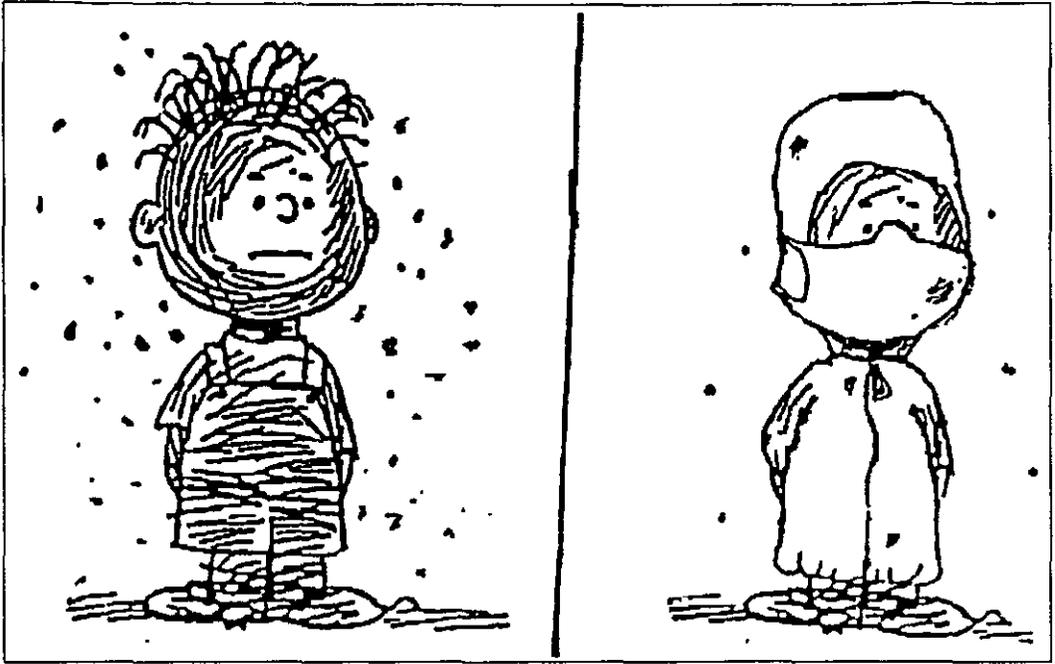


FIG. 6 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN

Se hacen las siguientes recomendaciones para ayudar a minimizar los problemas causados por el personal:

1. Limitar el numero de personal trabajando en el cuarto limpio.
2. Instruir al personal a moverse lenta y calmadamente para evitar turbulencia.
3. No permitir al personal deambular en su lugar de trabajo.
4. No permitir al personal congregarse en la vecindad del área de trabajo
5. El personal debe ser consciente de la dirección del flujo y no debe interrumpir este, con alguna parte de su cuerpo entre la fuente del flujo y su área de trabajo.

Todos los aspectos de cuartos limpios deben ser detallados en Procedimientos Estándar de Operación, puesto que cada actividad es importante.

De las recomendaciones anteriores en Gist-brocades se realizó lo siguiente: solo se permitía cuatro persona máximo por cada área y dos personas máximo por cuarto de trabajo.

A todo lo anterior es importante recalcar la gran importancia de contar con programas de entrenamiento periódico, los cuales se realizaban cada 6 meses, como un esfuerzo de la dirección para proveer conocimiento a las actividades y mejorar las habilidades en las áreas limpias. Pues lo rutinario de esta actividades puede ocasionar que se olviden, ya que algunos empleados asumen el dicho " **sino no se ve no existe**", siendo esto una **gran falacia**.

REGLAS GENERALES Y PROCEDIMIENTOS PARA TRABAJAR EN AMBIENTES ESTERILES.

Antes de ingresar a cualquier ambiente estéril, el personal debe comprender la responsabilidad de su posición y conocer las técnicas en cuartos limpios y sus sistemas de operación.

1. El personal debe reaccionar en forma efectiva durante contingencias tales, como fuego, falla eléctrica, rompimiento de contenedores, etc.
2. Debe conocer perfectamente bien las técnicas de vestimenta.
3. Sin excepción de personas, incluyendo los supervisores, controladores o personal de mantenimiento deben vestir el uniforme adecuado al cuarto limpio.
4. Ninguna vestimenta de cuarto limpio puede usarse nuevamente, sino ha sido lavada y reesterilizada.
5. Toda persona que trabaje en cuarto limpio debe conocer los procedimientos de esterilización y desinfección.
6. Una vez dentro del cuarto limpio, evitar regresar al área de vestido.
7. El uniforme debe guardarse en bolsas adecuadas para evitar su contaminación.
8. Por razones de eficiencia y confort, establecer un número mínimo de gente en la zonas de vestimenta.
9. Ningún artículo personal es permitido dentro de las zonas de producción.
10. Nadie puede ingresar al cuarto limpio si se encuentra enfermo, especialmente del estomago o del aparato respiratorio.
11. Las puertas de los diferentes cuartos deben permanecer siempre cerradas.
12. Prohibido el uso de cosméticos en cuartos limpios.

13. Todos los materiales, contenedores o equipo que ingrese a cuartos limpios debe de realizar una sanitización, por medio de un procedimiento previamente evaluado y validado.
14. Bajo ninguna circunstancia debe ingresarse con alimentos o bebidas a los cuartos limpios.
15. No debe ingresar papel o lápices, a menos que cumpla con características adecuadas a las zonas limpias.
16. No deben procesarse dos diferentes productos al mismo tiempo.
17. Deben existir procedimientos validados de limpieza y sanitización, así como los tiempos en los cuales debe realizar esta operación.

La motivación a los empleados es requerimiento importante, pues si se reconoce la capacidad del operador, se le motiva a participar en la detección y resolución de problemas, se le invita a participar en pocas palabras, este se siente responsable y participa en las mejoras.

Es importante también reconocer la importancia que tiene el controlar las áreas que rodean las instalaciones de los procesos asépticos, es decir, las naves industriales que rodean las instalaciones físicas de las áreas productivas, por lo que es conveniente restringir el uso de materiales que generen partículas y fibras, razón por la cual en GbIPM se realizaron las siguientes actividades:

1. Se instalaron esclusas para ingreso y egreso de materias primas y producto terminado. En esas esclusas se trasvasa la materia prima a contenedores de plástico, eliminando cuñetes y cajas, reduciendo el ingreso de materiales que generen fibras a las áreas grises.
2. Se cuenta con tarimas de acero inoxidable dedicadas a esta área, de tal forma que se mantengan siempre limpias.
3. Existe una esclusa para ingreso y egreso de material a áreas grises, donde existe los aditamentos necesarios para sanitizarse, además de colocarse un uniforme que impide la alta dispersión de contaminantes de nuestra ropa, para poder trabajar en áreas grises.

3.4.3 Capacitación del Analista.

Es importante la realización de ésta, pues involucra el dominio de la técnica de vestimenta, el comportamiento en áreas clase 100, el modo de efectuar la toma de muestras para disminuir el posible riesgo de contaminación por la introducción de medios de cultivo aptos para los microorganismos, la no interferencia en las actividades del operador, entre otras cosas.

En este punto quiero recalcar que la capacitación empezó por lo siguiente:

- Revisión de los procedimientos por los cuales se inicia actividades.
- Reconocimiento del área física donde se llevaban a cabo las operaciones de producción.
- Visualización de las zonas de producción que se tienen dentro del cuarto aséptico.
- Entrenamiento en la técnica de vestido (asesorado por otro analista).
- Entrenamiento en el comportamiento dentro del área aséptica (asesorado por otro analista).
- Entrenamiento en la lectura de placas, así como identificación preliminar de los microorganismos detectados.
- Sanitización de las placas, así como su identificación y acomodo para ingreso a las áreas de producción.

Para ingreso a acondicionamiento de placas, que también se realiza en áreas clase 100, en un espacio físico ajeno a las áreas productivas ingrese el 25 de octubre de 1996, por primera vez a realizar la actividad sin vigilancia de ninguna otra persona.

Para la actividad de monitoreo ambiental ingrese hasta el 18 de noviembre de 1996, a las áreas productivas con el consentimiento del supervisor de microbiología.

Como se aprecia tuvo un tiempo de capacitación bastante largo, aproximadamente más de un mes, pero esto refleja que tiene que dominarse correctamente las técnicas anteriormente descritas para que se permita la entrada a este tipo de áreas.

3.5 CONTROL DE LA CONTAMINACION: LIMPIEZA Y SANITIZACION.

El esfuerzo realizado en evaluar y validar las instalaciones, equipo y procesos para realizar dichos productos, por ende es necesario además realizar limpiezas y sanitizaciones periódicas.

3.5.1 Limpieza

Limpieza es simplemente la remoción de polvo, suciedad, basura, residuos; en fin la remoción de desperdicios en general, algunos ejemplos son:

Polvo o tierra, partículas, fibras, pelos, derrames, partículas resultantes de fricción en la maquinaria, aceite y grasa de partes móviles, residuos de productos, etc.

La limpieza del área aséptica se hace más difícil por la variedad de superficies que necesitan atención: coronillas separadoras, paredes, ventanas, pisos, techos, superficies de mesas, y maquinaria con complicadas superficies internas y externas. Por tal motivo primero debe limpiarse y posteriormente desinfectarse. Los pisos, paredes y superficies de trabajo deben ser desinfectadas regularmente.

Los desinfectantes pueden desactivarse con los agentes de suciedad (particularmente capas de suciedad grasa y con contenido de material proteico), los cuales protegen a los microorganismos de la acción de los desinfectantes. Es importante recordar que en ambos casos el agua juega un papel importante, por lo que es necesario utilizar el agua con la calidad adecuada, en estos casos se utiliza Agua Grado Inyectable (Sharp J. 1992, pp 31-35).

Aunque la esterilidad es lo principal en lo referente a cuartos limpios, también la prevención de contaminación por partículas no viables es un asunto importante, principalmente donde se fabrican productos grado inyectable.

Los factores a considerar que hacen a las partículas difíciles de remover incluyen fuerzas capilares, fuerzas electrostáticas, puentes químicos hidrogenados, solidificación térmica, adherencia, fuerzas de Van der Waals, deformación y embebimiento, rugosidad de la superficie, y gravedad (Cooper W.D., 1996 pp20-24).

Dentro de los atributos deseables de un limpiador líquido se encuentran:

- Reducir la tensión superficial a las superficies húmedas.
- Tener un componente acuoso, un solvente de hidrocarburo, y un componente alcalino para ayudar a disolver sustancias iónicas, aceites y grasas.
- Evaporar rápidamente.
- Dejar un residuo mínimo después de la evaporación.
- Contener un mínimo de metales, halógenos, y sustancias orgánicas volátiles.
- Tener un olor aceptable
- No ser tóxico, inflamable o perjudicial para el ozono.

3.5.2 Sanitización.

Sanitizante: sustancia o combinación de sustancias químicas, el cual al aplicarse a una superficie, reduce aproximadamente en un 95% el número de microorganismos presentes.

Desinfectante: agente químico que mata o inhibe a los microorganismos, pero no actúa sobre esporas, sólo se aplica sobre objetos.

Antiséptico: sustancia química, se aplica a la piel o membranas mucosas para impedir el crecimiento, inhibiendo o destruyendo a los microorganismos, pero por lo general no esteriliza un área determinada.

Las formas combinadas indican el tipo de acción que ejerce un agente sobre un microorganismo. El sufijo *-stasis* se refiere a la inhibición y *-cida* a un efecto mortal.

En todos los casos, se tiene una reducción de microorganismos, pero si cambia un poco la contextualización, por eso en lo presente se denominará sanitización.

El propósito general de los agentes sanitizantes debe ser efectivo para eliminar bacterias en cualquiera de sus formas (esporulada y/o vegetativa), así como hongos y levaduras. Y por otra parte el usuario debe considerar además otras características para su uso:

- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| ▪ No afecte al producto | - No corrosivo |
| ▪ Actividad antimicrobiana | - Estable |
| ▪ No tóxico | - Capacidad detergente |
| ▪ Barato y disponible | - Soluble |
| ▪ Homogéneo | - Activo a temperatura ambiente |

3.5.2.1 Tipos de desinfectantes

De acuerdo al mecanismo de acción que tiene sobre el organismo. Los principales factores que determinan la forma en la que actúa un desinfectante son la concentración del desinfectante, la duración de su acción, el número y tipos de microorganismos presentes y la naturaleza del material que se va a desinfectar.

Básicamente, para que en un desinfectante tenga efecto, debe influir en alguna parte vital de la célula. Las partes más sensibles a la acción de un desinfectante son la membrana citoplásmica, ciertas enzimas y las proteínas estructurales como las que se encuentran en la pared celular. (Volk Wesley A, 1996, pp 178-187).

Acción en la membrana citoplásmica.

Las células vivas tienen una membrana semipermeable que regula el paso de sustancias a través de esta. La lesión de la membrana permite que salgan de la célula los iones inorgánicos esenciales, los nucleótidos, las coenzimas y los aminoácidos. De esta forma la gravedad del daño ocasionará la muerte de la célula o su incapacidad para crecer. La membrana citoplásmica esta compuesta en forma primaria de proteínas y lípidos; como resultado, la membrana es muy susceptible a los agentes que disminuyen la tensión superficial, es decir, los tensoactivos. Todos los jabones y detergentes se incluyen, siendo los más importantes BENZALCONIO, FENOL, CRESOLES Y ALCOHOL ETÍLICO O PROPÍLICO.

Acción en las proteínas celulares.

Todas las reacciones metabólicas de la célula se catalizan mediante enzimas (generalmente compuestas de proteínas), estas incluyen las reacciones biosintéticas esenciales de las reacciones productoras de energía. Si algún compuesto se combina con dos o más enzimas impedirá que se lleve a cabo su función normal, ejerciendo una acción bacterioestática o bactericida. Dentro de estos agentes se encuentran los ÁCIDOS, ALCALIS, FENOL, CRESOL, ALCOHOL, SALES DE METALES PESADOS, FORMALDEHIDO, HALOGENOS, y otros agentes oxidantes como el PÉROXIDO DE HIDROGENO Y EL PERMANGANATO DE POTASIO.

3.5.2.2 Variables en la desinfección.

La efectividad de la desinfección química o por otros productos químicos depende de los organismos involucrados, el producto químico usado, el tiempo, la concentración, y la agitación mecánica.

❖ Concentración

Esta depende del material a desinfectar y del organismo que se va a destruir. En la mayoría de los casos una concentración alta es bactericida y una menor es bacterioestática.

❖ Tiempo

Es la cantidad de tiempo necesario para que el desinfectante actúa completamente sobre el microorganismos en forma efectiva.

❖ Temperatura

Es una regla general que el aumento en la temperatura acelera la velocidad de la reacción química. Un aumento generalmente de 10°C acelera al doble la velocidad de reacción.

❖ Naturaleza del medio adyacente.

El pH y la presencia de materiales extraños en el medio pueden influir en el proceso de desinfección. El pH actúa sobre los ácidos y álcalis. En otros casos, algunos agentes químicos se pueden combinar con los microorganismos o ciertos agentes pueden ser incapaces de penetrar las proteínas precipitadas y por lo tanto no dan el efecto deseado. Además independientemente del organismo o de la naturaleza química del agente, se ha comprobado que la presencia de materiales orgánicos disminuye el efecto destructor del desinfectante.

Todo lo anterior debe estar contemplado en un programa de evaluación de sanitizantes antes de que estos se lleven a las áreas de trabajo. La técnica de evaluación más utilizada es el denominado coeficiente fenólico, que implica la comparación del desinfectante a utilizar con el fenol, determinando posteriormente al tener los resultados un relación.

COEFICIENTE FENÓLICO

$$\text{coeficiente fenólico} = a / b$$

a= dilución del desinfectante al cual después de 10 min. no hay crecimiento pero en 5 si existe.

b= dilución de fenol más alta que en 10 min. no hay crecimiento pero en 5 si existe.

Sin embargo existe otra técnica, que se denomina "Curva de sobrevivientes" (Hidel-Walker Test). Esta consiste en la comprobación de la desinfección, dada una concentración del desinfectante (la recomendada por el fabricante), se pone en contacto con una suspensión bacteriana de concentración conocida por un determinado tiempo. Posteriormente se lleva la muestra a un medio de cultivo adecuado para determinar el por ciento de reducción. Esta técnica es la utilizada en Gist brocades IPM.

Además de enfatizar en el uso de programas de rotación de germicidas, para evitar la resistencia de algún microorganismos a dicho sanitizante debe tenerse presente su cambio anual. El reto de germicidas debe involucrar también a los microorganismos encontrados más frecuentemente en las áreas productivas, además de verificar la actividad del sanitizante en presencia del producto fabricado (en este caso Penicilina) para evaluar si existe inhibición o algún otra reacción adversa.

En el mercado existen una infinidad de productos, fabricados por diferentes compañías, y en base a las condiciones revisadas anteriormente se determina cual es la mejor para el uso en la compañía, algunos ejemplos se muestran en la tabla 6.

TABLA 6. NOMBRE Y PRINCIPIO ACTIVO DE ALGUNOS SANITIZANTES

Nombre	Principio Activo	Fabricante	Uso
GERMIKIN	sal de sodio-ortifenilfenol	DETERKIN	desinfectante
USSFAN F-64	Base fenólica	U.S. Sanitary de Mex.	limpiador, desinfectante, fungicida
USSFAN F-50	Base cuaternaria de amonio	U.S. Sanitary de Mex.	limpiador, desinfectante, desodorizante
GERMI GV	Bromoclorodimetilhidantoína	GV PRODUCTS	desinfectante
CHR	Base cuaternario de amonio	QUIMICA pH	detergente desinfectante
FENOL	Fenol		desinfectante
BENZALCONIO	Base cuaternaria de amonio		desinfectante, limpiador.

Es importante mencionar que debe limpiarse y/o sanitizarse de las zonas más limpias a las menos limpias, es decir, inicia desde techos- paredes – puertas – ventanas – pisos - esteras adhesivas - estaciones de trabajo donde termina.

Los principios son usar una progresión ordenada de las áreas más limpias a menos limpias, en trazos paralelos con pequeño ángulo de recubrimiento, y que evita la recontaminación de áreas limpias. Además de considerar que el programa de limpieza de las áreas se realiza de la siguiente manera:

Lunes primer turno : limpieza y sanitización.

Lunes segundo turno al Domingo tercer turno: sanitización al final de cada turno.

Limpieza general en cambio de campaña (cambio de producto a fabricar).

3.6 MÉTODOS DE EVALUACION AMBIENTAL

El uso de agentes sanitizantes bajo un programa bien establecido, aunado al aire filtrado, nos da como resultado un ambiente controlado, sin embargo, es necesario verificar que las concentraciones de partículas viables y no viables se mantengan bajo ciertos niveles.

El Monitoreo ambiental, tiene como objetivo asegurar la calidad del ambiente, incluyendo equipos y personal, para garantizar la esterilidad de los productos y por consiguiente cumplir con los criterios normativos en forma consistente.

Es especialmente importante considerar que el Monitoreo Ambiental en Gist-brocades IPM se realiza para verificar la calidad microbiológica de las áreas asépticas, determinando las condiciones de asepsia; por lo cual se cuenta con un programa cuidadosamente elaborado, en el cual se incluyen los sitios y la frecuencia de los muestreos. También es importante mencionar que cada empresa establece sus propios límites de acuerdo a la recopilación histórica y estadística (sin olvidar la normatividad existente), para demostrar que sus procesos son seguros y confiables.

Para establecer los programas así como los medios por los cuales se realizará la evaluación, se necesitan algunos tópicos e información, siendo una excelente guía el artículo: {1116} MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CLEANROOMS AND OTHER CONTROLLED ENVIRONMENTS, 1995.

El cual es desarrollado en la USP, y cuenta con amplia información sobre el tema.

Esta ampliamente reconocido que el Monitoreo Total por conteo de partículas, utilizando equipos electrónicos no provee información apropiada para un estatus microbiológico, ya que el límite base de conteo de partículas es con partículas de 0.5 micras (o menos), mientras que los microorganismos no flotan libremente como simples células, sino están relacionadas muy frecuentemente con partículas de 10 a 20 micras. Por lo que es importante separar ambos aspectos: material particulado y microorganismos.

El programa de monitoreo ambiental debe evaluar la efectividad de la limpieza y sanitización, la eficacia de la filtración en el sistema de aire, y la asepsia del operador.

El monitoreo ambiental de cuartos limpios controlados debe incluir cuantificación de contenido microbiano en **aire, superficies, equipo, pisos, paredes y vestimenta del personal**. El objetivo es obtener una estimación representativa del estatus microbiano del ambiente en un intervalo de tiempo determinado.

En este caso en particular es muy importante recalcar lo siguiente:

Para este tipo de áreas se desea no encontrar ningún tipo de contaminación, pero dado que históricamente se encuentran, lo deseable es detectar cualquier tipo de microorganismo (ya sea bacteria u hongo) para tomar las acciones correctivas. Toda bacteria detectada era sometida a identificación, siempre que excediera el límite de acción para la zona en específico, como se vera más adelante. Por otro lado, para revisión de la esterilidad del producto terminado se realiza la prueba de esterilidad como se indica en la USP, y lo que se busca es el crecimiento de cualquier microorganismo, por ende no se realizaban pruebas específicas para los microorganismos objetables (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp* y *E. coli*); cualquier crecimiento de bacterias se sometía a la identificación por el KIT.

3.6.1 Factores a considerar en el diseño de un programa de control microbiológico.

Se debe tener presente la selección del medio de cultivo usado para detectar y cuantificar a los microorganismos, los cuales pueden ser específicos. Es importante recordar que en Gist brocades ya se tenía diseñado el programa.

Se empleaba el medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína con 1% de la enzima penasa para desactivar el efecto de los polvos de Betalactámicos (suplemento para vencer el efecto sanitizante de antibióticos u otros productos que forman parte del proceso).

Este medio seleccionado es capaz de detectar y cuantificar microorganismos de humanos, agua y fuentes oleosas, que se encuentra en las áreas asépticas como se observaba en los diarios reportes que se generaban [de hecho se detectaban diversas especies de *Staphylococcus* (*warneri*, *epidermidis*, *simulans*), *Bacilos* Gram positivos (*Corynebacterium*, *Bacillus*), *bacilos* Gram negativos (*Enterobacter*)].

Además es requerida la detección periódica de hongos y levaduras utilizando medios micológicos tales como Sabouraud, también con penasa al 1%.

Nosotros realizamos el monitoreo con ambos medios diariamente.

Otro aspecto es la selección del programa de tiempo e incubación apropiada al medio seleccionado. Típicamente las temperaturas van de $22.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ y 5 días para hongos y levaduras; y $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ por 48 a 72 horas para bacterias. De hecho estos eran los parámetros que se habían asignado en la validación de las incubadoras para Monitoreo ambiental y con fundamento en diferentes bibliografías (FEUM MGA0381).

Un aspecto importante es lo relacionado a los medios de cultivo para Monitoreo Ambiental. En este sentido cabe mencionar que existen diferentes empresas que se dedican a vender todos las placas para monitoreo ambiental, con las características que la empresa necesita (es decir con el 1% de penasa).

Nuestro proveedor se llama Esensa S.A., quien nos facilitaba las placas tanto para monitoreo de aire como de superficies. Y solo se realizaban las pruebas de control de calidad como son la Promoción de Crecimiento de los lotes entregados, así como su Prueba de Esterilidad, una vez aprobado el lote, se almacenaba para su uso respetando el orden de Primeras entradas Primeras salidas.

3.6.2 Plan y sitios de muestreo.

La frecuencia de muestreo esta establecida según el tipo de área, además de la información histórica que se tenga recopilada, así como el tratamiento subsecuente después de la realización del proceso aséptico. Algunos frecuencias de muestreo se muestran en la tabla 7.

Lo anterior es sólo una guía de información para establecer inicialmente un plan de muestreo, pero en Gist-brocades ya se tenía alrededor de 12 años realizando esta actividad, además de que el producto terminado es un antibiótico.

TABLA 7.

FRECUENCIA DE MUESTREO EN BASE AL GRADO DE CONTROL AMBIENTAL.

ÁREAS DE MUESTREO	FRECUENCIA DE MUESTREO
Clase 100 o cuartos de mejor diseño	Cada turno
Áreas de soporte a clase 100(ej. 10,000)	Diariamente
Otras áreas de soporte (clase 100,000)	Dos veces por semana
Áreas de contacto potencial producto/contenedor Otras áreas de soporte a áreas de proceso aséptico Sin contacto con producto (Clase 100,000 o sin clasificación)	Una vez por semana
Productos de Esterilización terminal	
Áreas de contacto a producto	una vez por semana
Áreas sin contacto al producto	una vez cada 2 semanas
Dispositivo de esterilización terminal	
Áreas de contacto a producto	una vez cada 2 semanas
Áreas sin contacto al producto	una vez cada 3 semanas
Productos enterales estériles	
Áreas de contacto a producto	una vez cada 2 semanas
Áreas sin contacto al producto	una vez cada 3 semanas

Fuente {1116} MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CLEANROOMS AND OTHER CONTROLLED ENVIRONMENTS,
Pharmacopeial Forum, volume 21, Number 2, 1995.

La frecuencia del Monitoreo ambiental en Gist-brocades se realizó de la siguiente manera:

Se tenían 3 áreas asépticas que se utilizaban para fabricar 3 diferentes productos a la vez. El Monitoreo se realizaba una vez por día en cada área, la hora de muestreo quedaba a criterio del analista, y se podía realizar entre las 6:00 hrs hasta las 21:00 hrs. teniendo presente que una vez realizada la sanitización del área en cada turno se dejaba pasar una hora antes de ingresar a realizar el muestreo(si se ingresa dentro de las primeras 2 horas con respecto a la hora de la limpieza la biocarga es menor que después de las 5 horas con respecto a la limpieza).

EL monitoreo iniciaba de la zona más alejada con respecto a la entrada (zona de Mezclado/ensvasado) hacia esta (zona de Desvestidor).

La división de la zonas dentro del área aséptica esta dada por el proceso que sigue la fabricación del producto y se aprecia en la fig. 7.

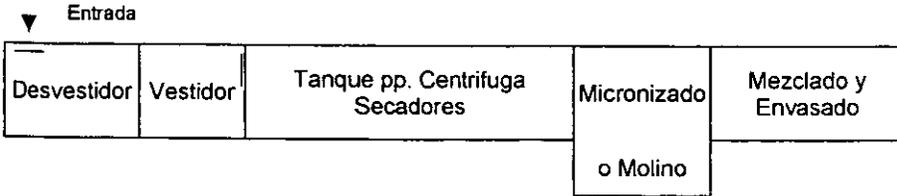


FIG. .7 ESQUEMA DE LA UBICACIÓN DE ZONAS EN ÁREAS ASÉPTICAS.

3.6.3 Límites de alerta y acción en ambientes controlados.

Límite de alerta.- nivel de calidad microbiológico o rango que, cuando es excedido, señala una potencial desviación de condiciones normales de operaciones y que no requiere acciones, pero necesita de un monitoreo más cuidadoso.

Límite de acción.- nivel de calidad microbiológico o rango, que cuando es excedido, señala una aparente desviación de la condiciones normales de operación y requiere de acciones correctivas.

Estos límites no forman parte de la calidad del producto, si no que es una forma de trabajar para proteger la calidad de los productos finales. La clasificación de ambientes limpios del Federal Standard 209E esta basado en el conteo de partículas de un medio ambiente relacionado. Pero la clasificación microbiológica no esta directamente relacionada al 209E, sino que la industria farmacéutica ha estado usando niveles microbianos correspondiente a compendios regulatorios (NASA, 1967 Microbiology of Clean Rooms).

Estos reportes y artículos relacionados presentan diferencias en sus valores ya que son obtenidos usando muestreadores diferentes, variabilidad de medios, y temperaturas de incubación.

A continuación se presentan valores promedios de límites de control microbiano:

TABLA 8. LÍMITES MICROBIANOS DE AIRE Y SUPERFICIE EN BASE AL <1116>.

Nivel de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el Aire.

clase*		UFC por metro cubico de aire**	UFC por pie Cubico de aire
SI	U.S.		
M3.5	100	menor de 3	Menor de 0.1
M5.5	10,000	menor de 20	Menor de 0.5
M6.5	100,000	menor de 100	Menor de 2.5

*Definido en el Federal Standard 209E, September 1992

** Un volumen suficiente de aire debe ser muestreado para producir resultados finitos.

Nivel de UFC para Superficies de Equipos e Instalaciones

clase		UFC por placa de contacto*
SI	U.S.	
M3.5	100	3
M5.5	10,000	5
M6.5	100,000	10

*Placa de contacto variable entre 24 a 30 centímetros cuadrados
Cuando se utilice un hisopo debe cubrirse un área mayor a 24 cm cuadrados pero menor a 30 cm cuadrados.

Nivel de UFC en Superficies del Uniforme del Operador.

Clase		UFC por placa de contacto	
SI	US	guantes	Mascara/botas/traje
M3.5	100	3	5
M5.5	10,000	20	10

*Placa de contacto variable entre 24 a 30 centímetros cuadrados cuando se utilice un hisopo debe cubrirse un área mayor a 24 cm cuadrados pero menor a 30 cm cuadrados. Fuente. {1116} MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CLEANROOMS AND OTHER CONTROLLED ENVIRONMENTS, 1995.

En la tabla 9, se muestran los límites que se venían manejando antes de ISO.

TABLA 9. LÍMITES MICROBIANOS ESTABLECIDOS EN Gist brocades IPM ANTES DE IMPLEMENTACIÓN ISO 9002.

Monitoreo a aire ambiental

CLASE		CENTRIFUGO UFC por placa 28 cm ²		EXPOSICIÓN UFC caja petri de 64 cm ²	
SI	US	ALERTA	ACCIÓN	ALERTA	ACCIÓN
M3.5	100	6	12	-	1
M5.5	10,000	8	14	-	10
M6.5	100,000	10	15	-	15

Monitoreo a superficies

CLASE		CONTACTO A SUPERFICIES UFC por placa 24 cm ²		EQUIPOS UFC por placa de 24 cm ²	
SI	US	ALERTA	ACCIÓN	ALERTA	ACCIÓN
M3.5	100	6	12	-	1
M5.5	10,000	8	14	-	10
M6.5	100,000	10	15	-	15

Monitoreo a operadores

Clase		UFC por placa de contacto	
SI	US	guantes	Traje
M3.5	100	1	2

En los procedimientos de monitoreo ambiental vigentes en ese momento, no existía documentación que respaldara la información de los límites establecidos hasta ese momento, se considera que estos habían sido obtenidos por los reportes históricos que se tenían de la empresa cuando se inicio esta actividad. Al estar realizando los preparativos para la certificación ISO 9002 se vio la necesidad de actualizar los límites, basándose en referencias documentales vigentes, tal como el <1116>, adaptando estos límites a la capacidad del sistema para tener cumplimiento satisfactorio. Por tal motivo a finales de 1997, se recopiló la información obtenida en el transcurso de ese

año para determinar las zonas que en lo sucesivo soportarían como puntos representativos el monitoreo ambiental de cada área.

Los límites quedaron de la siguiente manera

TABLA 10. LÍMITES MICROBIANOS DESPUES DE LA IMPLEMENTACIÓN DEL <1116> EN Gist brocades IPM

Monitoreo a aire ambiental

CLASE		CENTRIFUGO UFC por metro cúbico.	
SI	US	ALERTA	ACCIÓN
M3.5	100	3	3
M5.5	10,000	12	20
M6.5	100,000	50	100

Monitoreo a superficies

CLASE		CONTACTO A SUPERFICIES UFC por placa 24 cm ²		EQUIPOS UFC por placa de 24 cm ²	
SI	US	ALERTA	ACCIÓN	ALERTA	ACCIÓN
M3.5	100	5	10	2	3
M5.5	10,000	10	20	-	-
M6.5	100,000	50	100	-	-

Monitoreo a operadores

Clase		UFC por placa de 24 cm ²			
SI	US	Guantes		Traje	
		Alerta	Acción	Alerta	Acción
M3.5	100	2	3	3	5

De las comparaciones de la tablas 8, 9, y 10 se obtienen algunas conjeturas:

La tabla 9 muestra que los valores de límites en contacto a superficies a equipos y personal con respecto a lo recomendado en el <1116> se encuentran bastante cercanos, por lo que no existe una diferencia que pudiera afectar las consideraciones de la clasificación de las áreas en cuanto a contenido microbiológico; por otro lado, existe

un error de importancia en la interpretación de los valores a considerar para el método de muestreo al aire ambiental utilizando el equipo centrífugo, ya que este debe ser reportado y comparado contra unidad de volumen y no por crecimiento de UFC por placa.

En dado caso que se hiciera la conversión a la unidad de volumen sus límites quedan demasiados altos, por lo cual se considera errónea la conformación de los límites para el muestreo de aire por el método de centrífugo.

Por otra parte, en referencia al método de exposición de placas, como se menciono anteriormente la semicuantitatividad de éste muestreo, aunado a la reducción de costos, entre otras cosas, dio pie a su cancelación como método de muestreo.

En la tabla 10, se aprecia la corrección hecha de los errores que se tenían, soportado en el estudio estadístico que se realizó con datos reales de comportamiento microbiano de las áreas, a instancia de la Gerencia y Dirección de Calidad, con la supervisión de la jefatura de calidad, todo con fundamento del <1116> bibliografía ampliamente reconocida.

Para la interpretación de los datos, es conveniente tener presente algunas consideraciones técnicas:

1. La contaminación de un ambiente de producción debe ser considerada como una entidad discreta, no homogénea y dinámica.
2. Todos los microbios viables presentes en un sitio no pueden ser detectados debido a:
 - Diferencias en el crecimiento óptimo y condiciones de prueba entre microorganismos.
 - Rango de colonias sobrepuestas o antagonistas (particularmente si son conteos muy altos).
 - Técnica de muestreo.
 - El número de UFC puede ser solamente reflejo del número de partículas que sostienen a los microbios, no del total del número de microorganismos.
3. Como una consecuencia del retraso de la incubación por los métodos tradicionales, el control esta raramente basado sobre más que una revisión retrospectiva. Cuando los resultados son conocidos, adicionalmente se han realizado los controles de manufactura. Reexámenes de condiciones idénticas no son posibles.

4. La variación estacional es un factor de variación.
5. Hay limitaciones inherentes en el muestreo y examen para bajos niveles de microorganismos, especialmente donde solamente una porción de una población total es analizada. Limitada o pequeños volúmenes de muestra pueden no prever datos representativos, pero un número alto de muestras puede parcialmente compensar. El límite de detección del método de prueba debe ser considerado, especialmente cuando se obtienen cuentas con cero crecimiento.
6. El procedimiento de muestreo puede ser por si mismo sujeto de contaminación.
7. Ningún método de prueba sencillo puede completamente caracterizar la contaminación en un área o sobre una superficie.
8. El tiempo de muestreo puede no ser representativo de un ciclo de producción; sitios de muestreo pueden no ser representativos de todas las actividades del equipo en un área.
9. Las propiedades de contaminación pueden cambiar una vez que el aislamiento ha ocurrido.

Todo lo anterior aunado a la vigilancia de los cambios de microbiota encontrada en el transcurso de los muestreos, incrementos y/o decrementos de cuenta total, así como la correcta interpretación de los resultados, nos lleva a determinar patrones para prever posibles tendencias negativas a nuestro proceso aséptico (FUNDAMENTALS OF A MICROBIOLOGICAL ENVIRONMENTAL MONITORING PROGRAM, 1990).

3.6.4 Métodos e instrumentos para monitoreo ambiental

Existen una diversidad de métodos para realizar el monitoreo ambiental en áreas asépticas, pero en esta sección sólo describiremos los métodos utilizados en Gist-brocades.

❖ Muestreador centrífugo RCS (Reuter Centrifugal Samplers).

De lo más nuevo en sistemas de monitoreo ambiental. La unidad consiste de una hélice o turbina que aplica fuerza centrífuga, es decir funciona a base del principio de impactación. El detector recolecta microorganismos del aire y los deposita en un medio de cultivo. El aire examinado es aspirado desde una distancia de por lo menos 40 cm. por medio del extractor. El aire que entra al cilindro del centrífugo en forma concéntrica es puesto en movimiento en forma cónica y así las partículas contenidas en el aire se impactan en la tira de Agar mediante la fuerza centrífuga.

El aire entonces abandona el cilindro en forma de espiral por fuera del cono aspirado. Después de tomarse la muestra las tiras de Agar son incubadas y se cuentan las colonias.

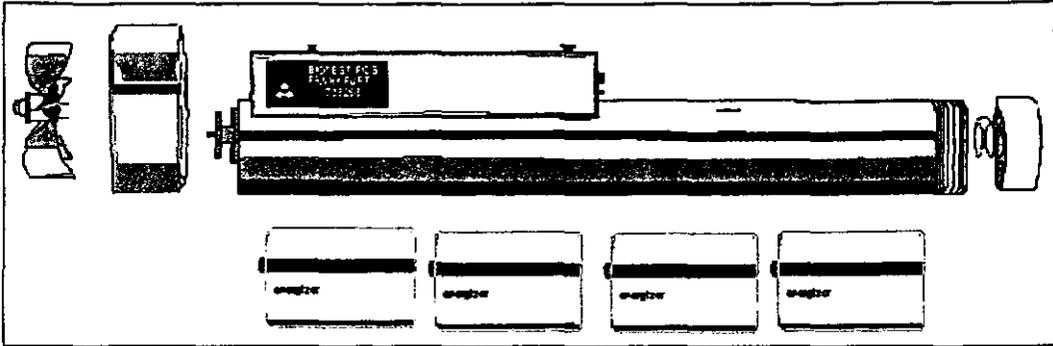


FIG. 8 BIOTEST RCS

Existen dos tipos de Biotest: el RCS y el RCS Plus. Ambos utilizan el mismo principio.

El RCS es el más sencillo, su control del tiempo de muestreo se controla por medio de botones en intervalos que van desde 30 segundos hasta 8 minutos, ofreciendo una capacidad de análisis de 20 a 320 litros, a una velocidad de 40 litros de aire por minuto.

El equipo utilizado debe ser calibrado y verificado de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Eficiencia de las baterías.
- Angulo de las aspas del abanico
- Tiempo de muestreo.

El equipo RCS Plus, es más novedoso. Tiene capacidad de almacenar un total de 10 volúmenes de muestreo diferentes. Presenta 7 memorias preestablecidas cuyos valores son: 10, 20 50, 100, 200, 500 y 1000 litros en orden ascendente. Las tres memorias restantes quedan disponibles para las necesidades de cada empresa y pueden ser desde 1 a 999 litros. Tiene una velocidad aproximada de 54 litros de aire por minuto. Tiene alarma sonora para indicar que se ha terminado el muestreo.

En estudios de este tipo de muestreadores se han encontrado existencia de una selectividad por partículas grandes. Las partículas grandes son más probables de contener microorganismos viables. Por ejemplo fragmentos de piel humana mayores a 10 micras de tamaño pueden usualmente contener microorganismos. Es un método veloz. Es flexible y portátil. No requiere diluciones.

Sin embargo se ha demostrado rompimiento de la linealidad del flujo de aire en la zona controlada que esta siendo muestreada. Los nuevos modelos reducen, pero no eliminan esta desventaja. No se conoce el límite de detección. Tienden a producir deshidratación del medio.

❖ Exposición de placas.

Aunque este método se dejó de utilizar a finales de 1997, en muchos lugares se sigue utilizando. Este representa el medio más simple de evaluación microbiológica del aire. Consiste en colocar cajas petri de 100 * 20 mm con un medio nutritivo en un lugar de muestreo previamente indicado que no afecte las actividades normales de operación, con la tapa abierta. Esta debe permanecer mínimo un tiempo de 30 minutos antes de ser retirada e incubada. Fácil de usar. No requiere subcultivos. Muy económico en lo individual.

La mayor desventaja de este método es que el volumen de aire muestreado y representado sobre la placa de Agar es desconocido. La colección eficiente es afectada por la temperatura del aire y su movimiento. La velocidad y dirección del flujo de aire influyen en el ángulo de exposición de la placa.

➤ Métodos de muestreo a superficie.

Existen 2 formas de realizar este tipo de muestreos:

❖ Por hisopo de algodón u otro material apropiado aséptico, los cuales son utilizados para muestrear en zonas de superficie irregular, posteriormente son colocados en tubos con medio de cultivo o solución salina para realizar la cuenta en placa. Se conoce el número de colonias por unidad. Tiende más a ser valorado como método cualitativo que como cuantitativo. La precisión es dependiente de la técnica y subsecuente cultivo. Recibe mucha manipulación. Y son muy poco utilizados en Gist-brocades.

- ❖ La segunda es por utilización de las placas RODAC (Replicate Organism Detection and Counting) las cuales son placas que contienen un medio nutritivo de Agar con una formación de un pequeño menisco y son usadas para muestrear superficies regulares o superficies planas y son directamente incubadas, el grado de contaminación por unidad de área puede ser determinada.

Existe la necesidad independientemente del medio que este sea enriquecido con la presencia de Polysorbato 80 y Lecitina con dos propósitos, uno es asistir en el completo contacto y remoción de microbios de la superficie de muestreo y el otro permitir la limpieza del área de muestreo con agua y/o solución sanitizante.

No es utilizable en superficies irregulares, deben limpiarse los residuos del área examinada, problemas de dispersión del crecimiento microbiano en la placa por exceso de humedad.

{ (<1116> MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CLEAN ROOMS AND OTHER CONTROLLED ENVIROMENTS,1995, pp 440-462) (Akers J.M, 1985.pp53-58) (FUNDAMENTALS OF A MICROBIOLOGICAL ENVIROMENTAL MONITORING PROGRAM,1990, pp S8-S16) (Manual de operación del Biotest RCS) (Manual de operación del Biotest RCS Plus.) }.



CAPITULO 4
ENDOTOXINAS BACTERIANAS



CAPITULO 4

- 4. ENDOTOXINAS BACTERIANAS.

4.1 ANTECEDENTES

La determinación febril (pirógenos) proviene de la preocupación de la industria farmacéutica por detectar estos compuestos, los cuales son componentes de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Las pruebas pueden ser cualitativas para detectar la presencia de endotoxina o también cuantitativa para determinar la concentración de endotoxina.

Si bien las endotoxinas no son los únicos agentes pirogénicos, las endotoxinas son los pirógenos que preocupan a la industria farmacéutica, principalmente la dedicada a preparar fármacos de uso parenteral.

Las otras fuentes de pirogenicidad (contaminación química o por partículas) pueden ser controladas siguiendo métodos de fabricación cuidadosos, pero las endotoxinas son difíciles de eliminar porque resisten la degradación por esterilización con vapor y no se eliminan tampoco por los medios normales de filtración. Un dato importante es considerar que las Endotoxinas tienen carácter **ubicuo** en la naturaleza, por lo que todas las superficies y aguas no tratadas deben considerarse en principio como pirógenas. Generalmente es muy costoso y en ocasiones prácticamente imposible eliminar la contaminación pirogenica una vez que se halle presente en la formula, por consiguiente es de interés de la industria prevenir que se encuentre en los ingredientes que la conforman, principalmente en el agua y posteriormente verificar el producto normal.

4.2 NATURALEZA DE LOS AGENTES PIROGÉNICOS.

Se comprendió enormemente al saberse que la contaminación pirógena está asociada con la existencia de enterobacterias, posteriormente se corroboró que existe en todas las bacterias Gram-negativas. El componente pirógeno de estos organismos es la endotoxina, complejo de polisacáridos y lípidos que se encuentran en la capa más externa de la pared celular.

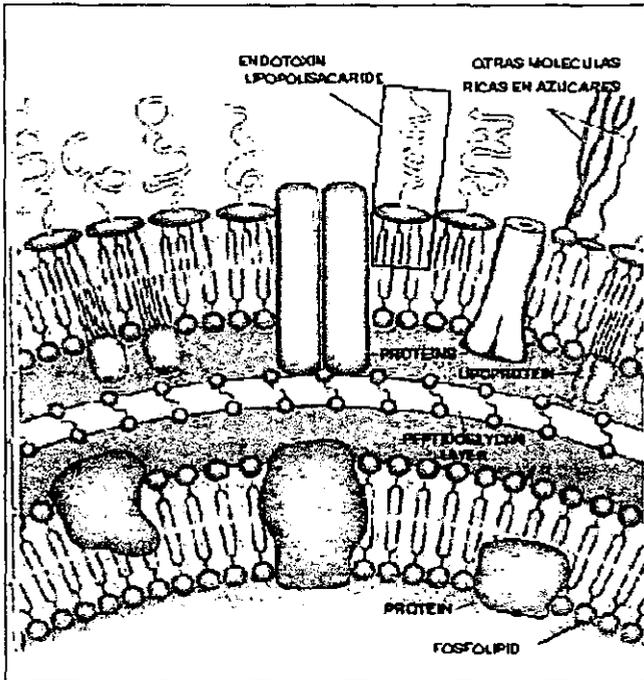


FIG. 9 UBICACIÓN DE ENDOTOXINAS EN LA MEMBRANA CELULAR

La estructura química de la endotoxina consiste de un polisacárido o largas cadenas de azúcares y una grasa llamada lípido A. El polisacárido que varía de una especie a otra, esta hecho de una cadena específica -O (construida de una repetición de unidades de 3 a 8 azúcares) y de 2 núcleos. El lípido A virtualmente siempre incluye 2 azúcares glucosaminas modificados por fosfato y un número variable de ácidos grasos (Rietschel E.T. and Brade 1992. Pp 54-61).

Los tejidos intactos tales como la pared interna del sistema gastrointestinal y la piel sana actúan como barreras protectoras frente a la intrusión de las endotoxinas bacterianas; por lo tanto estos sólo pueden llegar al sistema circulatorio cuando ingresan por medio de una inyección o a través de un tejido lesionado. Por ende la administración de un agente contaminado con endotoxina, puede inducir varias respuestas biológicas entre las que se encuentran: fiebre elevada, migración de

La endotoxina, muranil dipéptido, estimula a los leucocitos a liberar pirógenos. Los pirógenos son moléculas multifuncionales, pues además de inducir la elevación de temperatura tienen otros efectos relacionados con la defensa del organismo.

4.3 SISTEMA DE DETECCIÓN DE AGENTES PIROGENICOS.

Al reconocerse la necesidad de un método fiable para determinar la contaminación pirogenica, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) introdujo la prueba de Pirógenos en 1942.

PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS.

Los criterios para la prueba se basaron en un estudio conjunto realizado por la industria y por el gobierno sobre el efecto en los conejos de una endotoxina de *Pseudomonas*. La prueba ha demostrado ser eficaz; no obstante tiene sus desventajas y limitaciones, algunas y las más importantes son:

- Variabilidad biológica entre conejos.
- Crear tolerancia a bajos niveles de pirógenos.
- La prueba es costosa y consume mucho tiempo.
- Se requieren instalaciones amplias, con controles de humedad y temperatura.
- Personal entrenado en el manejo de animales y de la interpretación de los datos obtenidos.

Existe otra prueba para la detección de material pirogénico, la cual ha tenido un gran avance en la detección de pirógenos. Esta nueva prueba "*IN VITRO*" permite la simplificación de la prueba teniendo mayor efectividad y fiabilidad.

PRUEBA DE *Lymulus*.

De esta prueba se tienen referencias desde 1902 cuando Loeb reporta por primera vez la coagulación intravenosa en el *Lymulus Polyphemus*. En el transcurso del tiempo fueron varios los estudios realizados siendo en 1971, que varios investigadores Cooper, Levin y Wagner publicaron resultados de estudios utilizando lisado para detectar Endotoxinas en los radiofármacos, comprobándose la fiabilidad de la prueba.

Es por ello que en 1973, la FDA anunció que el LAL, derivado de las células que circulan en la sangre (amebocitos) del cangrejo de herradura (cacerola) (*Lymulus Polyphemus*), es un producto biológico, y como tal debe estar sujeto a requisitos de aprobación según se establece en su propia normatividad. Desde 1973, se ha probado que LAL es un indicador muy sensible a la presencia de endotoxina bacteriana (pirógenos), pero la información y experiencia LAL no eran adecuadas para apoyar su adopción final en sustitución a la prueba de pirógenos en conejos, por lo cual su uso quedó condicionado a pruebas de medicamentos y otros productos en proceso y que la decisión de utilizarla fuera tomada voluntariamente por las firmas autorizadas.

Fue hasta finales de 1977 que la FDA describió las condiciones para utilizar LAL como prueba de Endotoxinas en productos terminados, en productos biológicos para humanos y equipo médico.

Por tal motivo a partir de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXII), suplementos IV, V y VI, y la "Guidelines on the Validation of the *Lymulus* Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for the human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices" (publicada en 1987), se indica la sustitución del método tradicional en conejos por el Método de LAL, más específico, sensible y con una importante reducción en costo y tiempo de análisis (Zanabria A., Reyna M., Chiñas, D.; 1994. Pp 55-60.)

4.4 BASES BIOQUÍMICAS DE LA PRUEBA LAL.

El uso de LAL para detección de endotoxina se desarrollo de la observación de Loeb quién comunico que la infección de Bacterias Gram-negativas al *Lymulus Polyphemus* resultaba en una fatal coagulación intravascular, siendo Levín y Bang los primeros en sugerir la reacción de gelificación del lisado de límulo, por efecto de la endotoxina, regulado por un mecanismo enzimático.

Más tarde se demostró que este coágulo es el resultado de la acción entre la endotoxina y una proteína coagulante que circula en el amebocito.

El mecanismo de la reacción implica la activación de la enzima procoagulante por Ca^{2+} y endotoxina. Esta enzima activada cataliza el desdoblamiento del coagulógeno en subunidades de polipéptidos. La naturaleza química del coagulógeno y de sus subunidades coaguladas fue ampliamente estudiada en el *Tachypleus tridentatus*, una especie de cangrejo en herradura encontrado en el mar de Japón que tiene la misma respuesta a la endotoxina que el límulo.

Es estos estudios, las subunidades de coagulógeno se denominaron cadenas A, B, C de las cuales las cadenas A y B están interconexionadas por enlaces bisulfuros formando el coágulo. La cadena C, liberada de la porción interior de la molécula madre, no está incorporada al coágulo, véase fig. 11.

4.5 CORRELACIÓN HOMBRE-PRUEBA DE PIRÓGENOS Y LISADO DE AMEBOCITOS.

La prueba de pirógenos con conejos está basada en la presunción de que la dosis umbral de la endotoxina para provocar una reacción pirógenica es igual en el hombre que en el conejo. En base a las buenas prácticas de fabricación para evitar la contaminación por partículas y elementos químicos indeseables se cree que la mayoría, si no la totalidad de las reacciones pirogénicas producidas por soluciones transfundidas son debidas a contaminantes microbianos.

Como estaba claro que las Endotoxinas Bacterianas eran el pirógeno responsable, se han realizado estudios para comparar la respuesta febril del hombre y del conejo, utilizando filtrados de bacterias o preparaciones con Endotoxinas purificadas.

La dosis umbral de las diversas especies de Endotoxinas probadas es aproximadamente igual para el hombre y para el conejo, los datos facilitados por Wolff y Greisman se muestran en la tabla 11.

TABLA 11. COMPARACIÓN DEL UMBRAL DE SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE PIRÓGENOS EN EL HOMBRE Y EN EL CONEJO ANTE ENDOTOXINAS CONOCIDAS.

Endotoxina	Greisman		Wolff	
	Hombre	Conejo	Hombre	Conejo
	(ng/Kg.)	(ng/Kg.)	(ng/Kg.)	(ng/Kg.)
Pseudomona spp.	50-70	50-70	NR	NR
E. coli	1	1	NR	NR
S. Typhosa	1-1.4	0.1-1.4	5	50
S. Abortus equi.	NR	NR	2	5

NR.- No Reportado

Para los fabricantes y usuarios del Lisado de Amebocitos de Límulo la principal preocupación se centra en el nivel de sensibilidad necesario para que el lisado sea equivalente o superior a la prueba de Pirógenos con conejos. Por tal motivo Mallinckrodt el principal proveedor de LAL desarrollo un estudio de correlación entre la prueba de pirógenos USP (8 conejos dosis) y la prueba LAL (Pyrogen). La tabla 12 compara la dosis umbral de endotoxina en el conejo capaz de dar respuesta febril con el tiempo de gelificación correspondiente.

Se aprecia que las MDP_{50} para las diferentes endotoxinas puede variar considerablemente, el tiempo de gelificación (prueba Pyrogen) mantiene un paralelismo íntimo con la respuesta biológica (febril) en los conejos.

Los datos de la tabla 13, se obtuvieron con la fórmula del lisado existente antes de abril de 1976. La formula actual es como mínimo 5 veces más sensible.

**TABLA 12. DOSIS MÍNIMA PIROGÉNICA
(CONEJOS) CONTRA TIEMPO DE GELIFICACIÓN (LAL).**

Endotoxina (Westphal)	Conejos Dosis Mínima Pirogénica MPD ₅₀ * (ng/ml/kg.)	LAL Tiempo de Gelificación para MPD ₅₀ Concentración en ng/ml 50 (min.)
E. coli	0.55	20
K. pneumonia	3.5	37
Serr. Marcescens	1.4	30
Sal. Typhimurium	0.74	25
Sal. Minnesota	1.4	25
Sal. Enteritidis	1.6	25
Sal. Abortus equi.	1.35	30
Shig. Flexneri	0.9	20

MPD₅₀* Concentración mínima de endotoxina que causa una elevación de 0.6° C en la temperatura del 50% de los conejos experimentados a una dosis de 1ml/kg de peso.

Tiempo de gelificación Es el tiempo de incubación en minutos a 37°C necesario para que se forme un Gel firme de una mezcla de Lisado y suspensión de endotoxina a partes iguales.

La tabla 13 muestra la sensibilidad de la formula del lisado de Mallinckrodt (Pyrogen) después de 1973, para lotes específicos investigados por Mallinckrodt. El reactivo PYROGENT ha sido estandarizado para determinar 0.01 0.05 ng/ml de endotoxina E. Coli (incluida en cada Kit).

En resumen, el estudio comparativo determinó que la dosis umbral de endotoxina esta en el rango de 0.55 – 3.5 ng/ml/Kg. de peso del conejo mientras que las sensibilidades en la prueba del limulo estaban en el rango de 0.01 ng/ml. Por lo que la prueba de Lymulus (Pyrogen) es mínimo 10 veces más sensible que la prueba de pirógenos en conejos (Manual de información técnica para la Prueba de Endotoxinas Bacterianas por el método de Lisado de Amebocitos del Limulo Pyrogen^R, Edit. Mallinckrodt, Inc.).

TABLA 13. SENSIBILIDAD DEL LISADO ANTE VARIAS ENDOTOXINAS

Endotoxina	Sensibilidad* LAL Pyrogen (ng/ml)
E. coli	0.025
Sal. minnesota	0.05
Sal. typhimurium	0.05
Shig. flexneri	0.05
Sal. enteritidis	0.01
Serr. marcescens	0.01
K pneumonia (FDA referencia)	0.14
E coli (referencia propuesta FDA)	0.062

(*) mínima concentración de endotoxina que da gel después de una hora de incubación.

En Gist-brocades IPM la prueba de validación de uso LAL fue realizada a mediados de 1995, en la cual no forme parte del grupo que realizó los estudios para sustitución de Pirogénos en conejos por LAL *in vitro*, pero se pueden rescatar algunos datos de manera general.

La prueba se realizo utilizando 3 tipos de Penicilina G: Sódica, Benzatina, Procaína y una mezcla de Procaína *Sódica 3:1.

La investigación se realizó utilizando un rango de prueba de Endotoxina: 160, 80, 40, 20, 15, 10, 6, 5, 4, 3,2 y 1 UE/ml. En 36 conejos nuevos, 3 conejos por concentración de endotoxina. Utilizando 3 lotes diferentes de cada producto.

Para LAL se determino utilizar un rango de 1, .5, .25, .125, .06 y 0.03 UE/ml, realizando una mezcla de producto con endotoxina para la prueba de Inhibición/ Realce. Utilizando 3 lotes diferentes de cada producto.

Los resultados al final del estudio indican que en promedio a partir de 4 UE/ml más del 33.3% de los conejos responden con un incremento de temperatura > a 0.5°C. Mientras que LAL con una sensibilidad de 0.06 UE/ml presenta la formación de un gel firme, a 37°C en alrededor de una hora. Por lo que el método LAL tiene aproximadamente una

sensibilidad 66.66 veces más que el método de pirógenos para este tipo de productos Betalactámicos. Es importante mencionar que además de utilizar la prueba LAL para los productos fabricados también se utilizaba para medir la cantidad de endotoxina bacteriana en el agua, usada para fabricación y que es del tipo de Osmosis Inversa, la cual se consideraba Agua Grado Inyectable y por ende requiere de un cumplimiento normativo (aspecto, conductividad, Endotoxinas Bacterianas y sustancias oxidables).

4.6 FACTORES QUE PUEDEN INTERFERIR LA PRUEBA.

Los factores que pueden interferir en la realización de la gelificación de la prueba LAL, son el pH, la temperatura, el tiempo y la concentración de la endotoxina.

La concentración de la endotoxina es una variable que no depende de la manipulación de los analistas, sino que es la variable que nosotros deseamos conocer, por ende no podemos conocerla antes de realizar la prueba (a excepción de cuando se trate de los testigos positivos o de las pruebas de Validación de LAL correspondientes).

La temperatura es una variable que sí podemos controlar, según la bibliografía debemos tener una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ controlada por baño maría, teniendo un tiempo de incubación de 1 hora \pm 2 minutos.

Tal vez el parámetro más importante a considerar sea el del pH, donde se aprecian algunas cuestiones interesantes.

En la Farmacopea Mexicana y el manual de LAL, recomienda que la solución se ajuste entre un pH 6.0 - 7.5 donde se tiene mayor actividad del lisado, pero la Farmacopea Europea recomienda que sean entre un rango de pH de 6.5 a 7.5, ya que la adición del lisado a la muestra puede resultar en la disminución del pH, por lo cual se recomienda que el pH de la muestra al ser examinada no sea menor a 6.5; es cierto que la muestra y el lisado puede dar reacción positiva por debajo del valor pH 6.0, pero también es verdad que esta condición disminuye la efectividad de la prueba por manejar un intervalo de pH que no es acorde al óptimo de la reacción de gelificación, lo que ocasionaría considerar un falso negativo cuando no lo es.

Una reacción positiva esta indicada por la formación de un gel firme, y que al ser invertido en 180° permanece intacto. Una prueba es negativa cuando no se forma gel o aún formándose pierde su consistencia al invertir el tubo.

Hay que tener en cuenta que las concentraciones de endotoxina por debajo del nivel pirogénico umbral pueden provocar floculación, granulación y/o aumento de la viscosidad, sin embargo este tipo de reacciones son consideradas negativas. Para todas las corridas es importante contar con testigos positivos y negativos que nos ayudaran a detectar si la prueba es valida, fallida o si es necesario realizar repeticiones.

4.7 ASPECTOS PRACTICOS

La prueba de endotoxinas bacterianas la empecé a realizar oficialmente en Enero de 1999 hasta Marzo del 2000, durante este periodo analice 241 muestras por duplicado de Producto terminado, más los análisis al agua grado inyectable utilizada en producción que me tocaba realizar al menos 3 veces por semana.

La realización de la prueba no es difícil, pero se requiere de un poco de entrenamiento, y no dejar pasar ningún detalle en cuanto a ajuste de pH, parámetro que más nos interfiere en la realización de la prueba.

Realizar las calificaciones indicadas cuando se cambie de lote de LAL, y demás instrucciones mencionadas en el mismo manual del producto.

Como se menciono al inicio de este trabajo, eran diferentes los productos que se fabricaban unos en mayor escala que otros, por ende era conveniente conocer parte de su comportamiento en solución, por ejemplo:

La Pen. G Clemizol era disuelta en DMF y posteriormente se llevaba con agua al volumen de aforo correspondiente, lo cual ocasionaba que la solución estuviera en un pH de 4.5 en promedio, la Pen. G Benzatina que era necesario disolver en NaOH 0.01N y agua, daba un pH de 10.0 en promedio, la Pen. G Potásica cuya solución se encuentra alrededor de pH de 5.80, y la Pen. G. Procaína que estaba alrededor de pH 6.1. Con este conocimiento se estableció un volumen promedio de HCl o NaOH que era necesario adicionar para ajustar el pH a valores adecuados, es decir, para que el ajuste fuera lo más cercano a lo indicado y disminuir la manipulación excesiva por adición de una u otra solución de NaOH o HCl.

Durante la incubación es importante no producir movimientos o vibraciones bruscas a la superficie donde se tiene el baño maría, para evitar posibles rompimientos del gel y tener falsos negativos.

Otro aspecto importante es la validación de los ciclos de despirogenización del material que se utiliza para la prueba como son las pipetas y los matrazes de aforo principalmente, para tener seguridad que los tiempos y temperaturas alcanzadas por el horno de calor seco son las adecuadas, ya que la bibliografía reporta algunos datos, pero es conveniente conocer las condiciones del equipo con que se cuenta para tener una optimización y amplia seguridad de las condiciones del o de los equipos utilizado.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- La Microbiología Farmacéutica tiene diferentes aplicaciones de gran ayuda para la industria si se logra establecer la correcta integración entre los conocimientos y la práctica, en este caso resalta la aplicación de procesos asépticos como objetivo principal.

- Destaca la importancia de la aplicación de un Sistema de Aseguramiento de Calidad como el detonador de un proceso de mejora continua que ayuda a dar la optimización de recursos, la calidad como forma de vida y la satisfacción total del cliente, para competir en un mercado cada vez más globalizado, sin importar la actividad que cada persona realice.

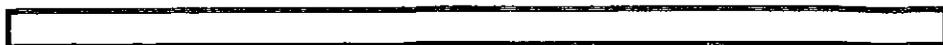
- La Microbiología Farmacéutica se relaciona con la aplicación de diferentes Normas tanto Nacionales como Internacionales, ayudándonos a comprender el porque de las restricciones y darle más énfasis en su cumplimiento; entre estas destacan las NOM vinculadas al ramo farmacéutico como: NOM-059-SSA1-1993 "BUENAS PRACTICAS DE FABRICACION PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO - FARMACEUTICA", NOM-060-SSA1-1993 "REGULACIÓN SANITARIA PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUIMICO - FARMACÉUTICA"; las guías editadas por Asociaciones relacionadas al ramo como la "GUIA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA FARMACEUTICA" del CIPAM; y Normatividad Internacional como ISO en sus modelos de Aseguramiento de la Calidad, GMP's y el modelo en Administración Ambiental ISO 14001.

- Los conocimientos adquiridos sobre Microbiología Farmacéutica nos ayudan a evaluar, corregir y proponer los métodos, procedimientos y manuales operativos utilizados y acciones para verificar la Calidad de ambientes en áreas asépticas, sin olvidar abrir los canales de comunicación entre los diferentes niveles del organigrama de la empresa, para determinar ventajas y desventajas de cualquier actividad que influya en la naturaleza propia del proceso, así como de recomendaciones para optimizar los procesos y comportamientos dentro del área.

- Enfatizar la amplia capacidad de actividades que un Q.F.B puede realizar como consecuencia de los diferentes procesos de producción, ya que se cuenta con la base académica necesaria y el deseo de superación personal.



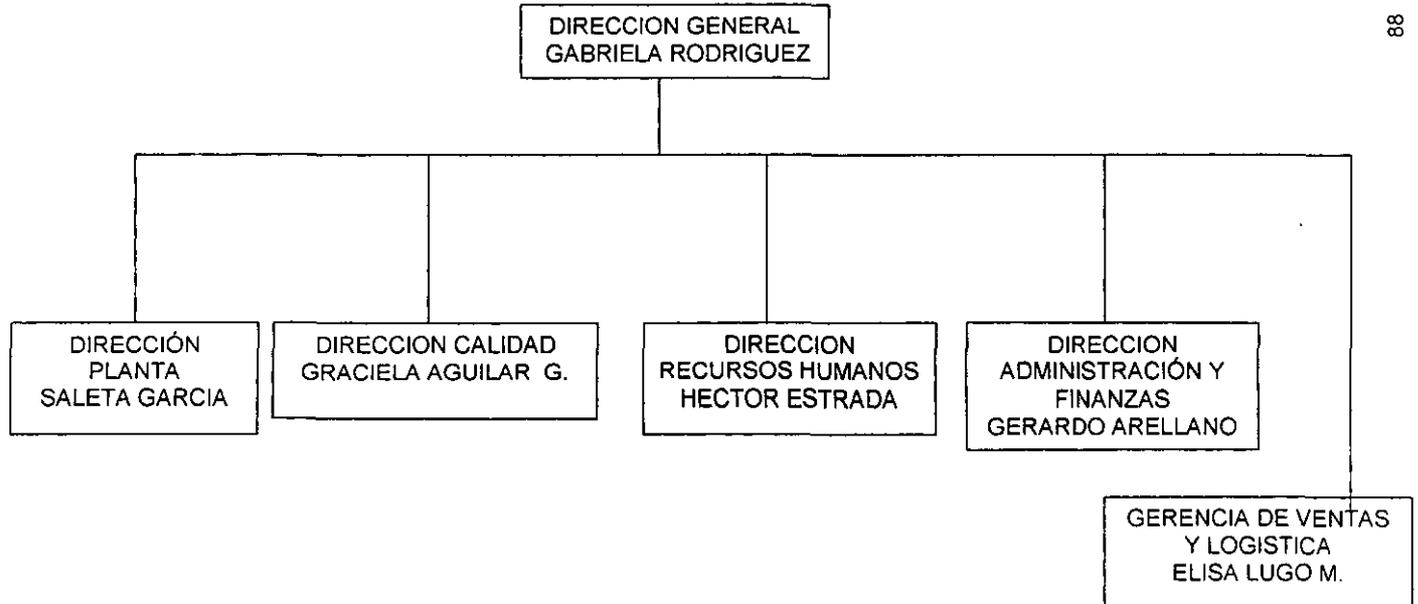
ANEXOS



ANEXO I

ORGANIGRAMA Gist-brocades IPM

ORGANIGRAMA DE NIVEL DIRECTIVO

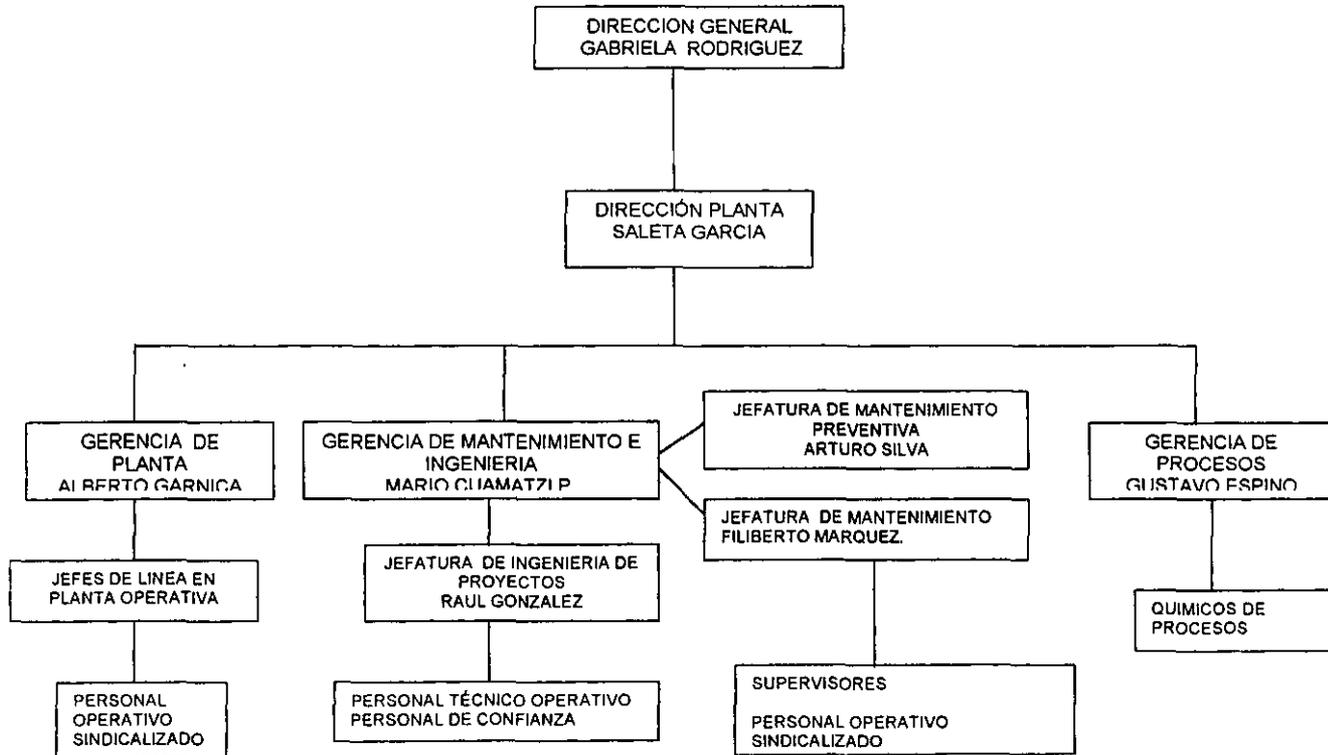


ANEXO I

ORGANIGRAMA Gist-brocades IPM

ORGANIGRAMA DE LA UNIDAD DE PRODUCCION

RAG

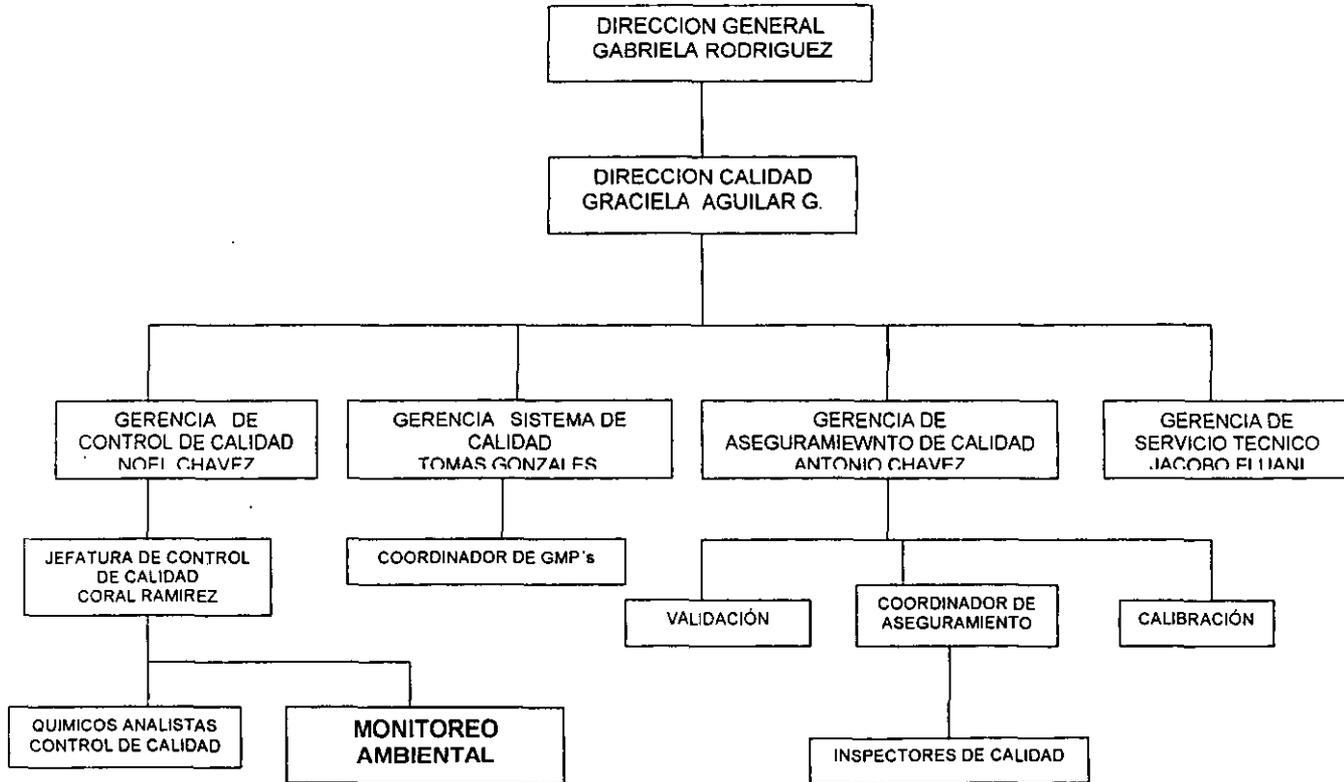


ANEXO I

ORGANIGRAMA Gist-brocades IPM

ORGANIGRAMA DE LA UNIDAD DE CALIDAD

RAU



ANEXO 2

NORMA ISO 9002

1. RESPONSABILIDADES DE LA DIRECCIÓN

Establecer la política de calidad.

Definir las responsabilidades, así como su documentación.

Identificar los recursos y proporcionar los faltantes.

Designar el representante, junto con las responsabilidades.

Revisar el sistema a intervalos dirigidos, y con registros de tales revisiones.

2. SISTEMA DE CALIDAD

Establecimiento, documentación y soporte al sistema de calidad, para asegurar que el producto es conforme con los requisitos especificados.

Congruencia del Manual de calidad con la norma ISO 9002.

Implantación efectiva del sistema, así como adecuada descripción del procedimiento con el trabajo a realizar.

3. REVISION DEL CONTRATO

Establecer y mantener procedimientos documentados de la revisión del contrato para asegurar que se revisen todas las características que comprenden los compromisos técnicos, legales financieros, etc., y su pueda tener cumplimiento, así como registros de dichas verificaciones.

4. CONTROL DE DOCUMENTOS Y DATOS

Diseñar, implementar e implantar los mecanismos necesarios para el control de documentos, tanto internos como externos, de tal manera que podamos conocer su estado de actualización, procesos de cambio, implantación, etc., así como de establecer un listado maestro de documentos, con el debido respaldo de información, además de establecer los cambio necesarios de manera oportuna.

5. ADQUISICIONES

Desarrollar o establecer los mecanismos necesarios para que la empresa tenga el control de sus compras, así como el seguimiento de sus proveedores, para asegurarse que lo adquirido cumple con los requisitos. Se recomienda evaluar a los proveedores, así como subcontratista, y realizar verificaciones para conocer el grado de implantación de su propio sistema de calidad.

6. CONTROL DE PRODUCTOS PROPORCIONADOS POR EL CLIENTE

Establecer la evidencia o los mecanismo que aseguren que los productos proporcionado por el cliente cumplan con especificaciones, además de que son mantenidos de las condiciones de almacenamiento adecuadas, y de lo contrario establecer el mecanismo que permita informar oportunamente de las desviaciones.

7. IDENTIFICACIÓN Y RASTREABILIDAD

Establecer mecanismos para la correcta identificación de los productos, así como en el adecuado rastreo de lotes que por alguna circunstancia tengan algún problema.

8. CONTROL DEL PROCESOS

Identificar y planear procesos de producción, instalación y prueba, así como definir los parámetros para producir bajo condiciones controladas. Para este también es oportuno contar con un sistema de mantenimiento preventivo de la maquinaria, equipo, herramientas, etc., que son necesarias para realizar el proceso de transformación, teniendo presente mantener siempre la capacidad de producción.

9. INSPECCIÓN Y PRUEBA

Determinar los mecanismos para realizar las verificaciones, la frecuencia de inspección y en general la planificación de todos los recursos que sean necesarios para asegurar que los procesos están controlados en el recibo de los materiales, en los procesos de producción, etc. Además de asegurar que el equipo de revisión. Calibración y prueba cumple con la capacidad de medición requerida, estableciendo periodos de reexaminación, manteniendo datos de registro y estar disponibles en cualquier momento.

10. CONTROL DE EQUIPOS DE INSPECCIÓN Y PRUEBA.

Determinar las mediciones a hacer, la exactitud requerida y el equipo apropiado, planear cuando se llevan cabo las evaluaciones, certificaciones, mantenimiento y control de equipos en laboratorios acreditados y con patrones nacionales o internacionales reconocidos, de lo contrario documentar las bases.

Definir el método de calibración incluyendo: equipo, identificación, localización, frecuencia, métodos de verificación, criterio de aceptación y acción correctiva cuando no sea satisfactoria.

11. ESTADO DE INSPECCIÓN Y PRUEBA

Es la indicación que guardan los productos para indicar su conformidad o no, durante las diferentes etapas del proceso.

12. CONTROL DE PRODUCTO NO CONFORME

Aun considerándose que el sistema de calidad no debe producir mermas, errores o rechazos, esto es una realidad, por lo que se hace necesario establecer un sistema adecuado para saber que hacer con los materiales no conformes, identificados y disponiendo de ellos en un lugar reservado para ello.

13. ACCIONES CORRECTIVAS Y PREVENTIVAS

Es lo que se conoce como el proceso de mejora continua, ya que se reconoce pueden mejorar los procesos operativos y administrativos, iniciando acciones de prevención, pero cuando suceden problemas se establecen y documentan acciones apropiadas a la magnitud del problema detectado.

14. MANEJO, ALMACENAMIENTO, CONSERVACIÓN Y ENTREGA

Establecer y mantener los mecanismos necesarios para establecer la forma de manejar, almacenar, empacar, conservar y entregar el producto, así como la revisión periódica para establecer algún daño o deterioro en el almacenamiento. Establecer niveles de inventario que son requeridos para cumplir con los requisitos de producción.

15. CONTROL DE REGISTROS DE CALIDAD

Establecer la documentación necesaria para identificar, recopilar, codificar, acceder, archivar, almacenar y disponer de los registros de calidad, ya que estas se requieran en forma oportuna y legible cada que se realice una auditoría tanto externa como interna. Además es importante establecer los tiempos de conservación de los registros.

16. AUDITORIAS DE CALIDAD

Establecer parámetros de medición del grado de avance de la implantación del sistema de calidad. Así como establecer la forma de llevar a cabo las auditorías, indicando que la auditoría debe ser realizada por personal ajeno al área a auditar. De los resultados se debe dar al responsable del área y se deben presentar las acciones correctivas para esas áreas de oportunidad.

17. CAPACITACIÓN

Esta parte involucra la parte humana del sistema, siendo necesario definir las características del personal, tanto de los requisitos de su propia función, como de la toma de decisiones a la cual se enfrenta. El personal ejecuta tareas en base a su educación, experiencia y entrenamiento.

18. SERVICIO

Implantación de los mecanismos de como dar el servicio en las diferentes condiciones en las que se puede presentar esa relación, principalmente mediante la retroalimentación del servicio posventa, además de verificar e informar si el servicio cumple con los requisitos especificados.

19. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.

Todo procedimiento que se defina, necesita identificar sus necesidades, por lo que es necesario: establecer, controlar y verificar la capacidad del proceso y de las características del producto.

ANEXO III

BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA

a) GENERALIDADES

Las regulaciones contenidas en este artículo, son las mínimos requerimientos de Buenas Practicas de Manufactura para la preparación de medicamentos de uso humano y animal. Están hechas con el fin de establecer mecanismos de control en los métodos de manufactura, proceso, empaque y embalaje de fármacos, para asegurar ... que tales fármacos cumplen los requerimientos de seguridad, identidad, y potencia, así como de las características de calidad y pureza para los cuales han sido diseñados.

b) ORGANIZACIÓN Y PERSONAL

- Establecer las responsabilidades de la unidad de calidad, ya que su función es aprobar o rechazar los procedimientos y/o especificaciones que impacten la identidad, fuerza, calidad y pureza del fármaco.
- Personal Calificado, es decir, debe tener educación, entrenamiento y experiencia para realizar sus funciones, de lo contrario establecer los programas necesarios para alcanzar la capacitación por personal altamente calificado. Además debe existir el personal adecuado en número según las actividades a realizar.
- Responsabilidades del personal, debe guardar todas las medidas higiénicas, y de comportamiento según las áreas donde realice su actividad. Cualquier persona con lesión debe evitar el contacto a las áreas operativas.

c) EDIFICIOS E INSTALACIONES

- El diseño y características de construcciones, deben ser de tamaño adecuado y espacio suficiente para evitar contaminación y mezclas durante las operaciones diarias. Además de ser accesibles para realizar su limpieza, mantenimiento y las labores diarias.
- Debe de contarse con la cantidad de luz suficiente en todas las áreas.
- Debe existir un adecuado sistema de ventilación. Contar con equipo adecuado para controlar la presión, polvo, humedad y temperatura, los sistema de filtración de aire debe incluir prefiltros, y filtros para material particulado. Todo equipo o sistema de manufactura para penicilinas debe encontrarse totalmente separado de otros fármacos de uso humano.

- ❑ Debe contarse con adecuados procedimiento de desecho, los cuales deben disponerse de manera segura y sanitaria.
- ❑ Sanitización. Los edificios usados en la manufactura, producción, empaque y/o embalaje deben mantenerse limpios y en condiciones sanitarias, libres de roedores, pájaros, insectos y otras plagas. La basura y residuos orgánicos deben eliminarse en tiempo y forma sanitaria.
- ❑ Deben existir programas, procedimientos, asignación de responsabilidades, materiales y equipos para la limpieza de las instalaciones.
- ❑ Debe contarse con un programa de mantenimiento preventivo, así como de instalaciones adecuadas.

d) EQUIPO

- ❑ El equipo usado en la manufactura, proceso, empaque y embalaje debe ser del diseño, tamaño y capacidad adecuado, facilitando siempre su limpieza.
- ❑ La construcción de los equipos debe ser de materiales que no reaccionen con el principio activo, ni cambie alguna de las propiedades de identidad, fuerza, calidad o pureza del mismo. Las sustancias necesarias para la operación de equipos tales como lubricantes o aceites, no deben estar en contacto con el principio activo.
- ❑ Todos los equipos y utensilios deben limpiarse, mantenerse y sanitizarse a intervalos previamente establecidos para prevenir malfuncionamiento o contaminación que afecten la calidad del activo. Deben establecerse procedimientos de operación para cada actividad, así como esquemas de limpieza y Sanitización, indicando el responsable de la actividad, y debe guardarse la evidencia documental de tales actividades.
- ❑ El equipo automático, mecánico o electrónico, es necesario realizar pruebas de optimo funcionamiento, además de las calibraciones e inspecciones necesarias, de acuerdo a programas previamente establecidos. Además se debe contar con los controles necesarios para evitar al personal no autorizado el acceso a equipos como computadoras y previniendo el mal uso de la información que en ella se tenga.
- ❑ Los filtros para líquidos usados en la manufactura o empaque de fármacos inyectables para uso humano no debe liberar fibras (ejemplo más claro el asbesto), por lo que es indispensable que sean de materiales que no liberen fibras, recomendándose filtros con un tamaño promedio de porosidad de 0.22 micras.

e) CONTROLES DE MATERIAS PRIMAS, CONTENEDORES Y CIERRES.

- Deben existir procedimientos describiendo en detalle la recepción, almacenaje, manejo, muestreo, prueba y aprobación o rechazo de los contenedores y cierres. Debe existir un adecuado manejo para evitar la contaminación. Además de estar perfectamente identificados con un código, el cual debe registrarse para conocer la disposición de dicho lote.
- Cuando se recibe un grupo de contenedores, empaque primario o cierres deben ser examinados visualmente para observar daños o roturas, así como posible contaminación.
- Cada lote de componentes debe ser muestreado en cantidad representativa bajo criterios estadísticos para ser examinado, además de liberarlo apropiadamente para su uso por la unidad de control de calidad.
- Deben tomarse las medidas de prevención para evitar contaminación del producto. Una vez tomada la muestra debe ser identificada para evitar confusiones posteriores. De todos los materiales se deben contar las especificaciones de identidad, pureza y calidad. Cuando sea necesario también podrán ser analizados microscópicamente todo lote que cumpla las especificaciones puede aprobarse y en caso contrario rechazarse.

f) CONTROLES DE PRODUCCIÓN Y PROCESO

- Deben existir procedimientos escritos de manufactura y control de procesos diseñados para tener la Identidad, fuerza, calidad y pureza durante cada etapa del proceso. Tales procedimientos servirán para monitorear como se va comportando el producto en las diferentes etapas., teniendo la obligación de reportar cualquier desviación y documentarla.
- Debe haber especificaciones en proceso congruentes con las especificaciones del producto terminado. Los procedimientos de control y manufactura deben ser diseñados para asegurar que los fármacos producidos tiene la identidad, potencia, calidad y pureza de su naturaleza.
- Deben determinarse los porcentajes rendimiento teórico contra lo obtenido, y los cálculos deben realizarse por una segunda persona.
- Debe identificarse el equipo utilizado durante la producción de un lote indicando su contenido, con un número o código que corresponderá con el lote mismo.
- Debe contarse con los tiempos promedios del cual el producto debe estar en cada fase del proceso, y evitar con esto contaminación o degradación del mismo.

- Deben existir procedimientos que aseguren la prevención del crecimiento microbiano, aunque los productos sean o no estériles.
- Deben establecerse procedimientos específicos en los casos de reprocesos cuando los productos presente no conformidad con los estándares, describiendo los pasos para establecer esa conformidad.
- g) CONTROLES DE EMPAQUE Y ETIQUETADO
 - Deben existir procedimientos con suficientes detalles para la recepción, identificación, almacenaje, manejo, muestreo, examinación, y/o prueba de marcaje y empaque de materiales, y deben ser realizados sin desviaciones. Debe existir las especificaciones para su liberación o rechazo. Cada embarque debe recibir un número de lote diferente, indicando todas sus características, además de su etapa del proceso de inspección.
 - Debe existir un estricto control sobre el etiquetado que se distribuye para las operaciones de marcaje, este debe ser estrictamente examinado para su uso dado que las características como son identidad y conformidad del producto sean las misma que denota la etiqueta.
 - Deben existir procedimientos para reconciliación de pesos, entre las cantidades distribuidas y las obtenidas del producto final.
 - Etiquetas sobrantes deben ser destruidas.
 - Deben existir procedimientos diseñados para asegurar el correcto rotulo, marcaje, y material de empaque para cada tipo de fármaco; incorporando:
 - Prevención de mezclas y contaminación cruzada por separaciones físicas de las operaciones con otros fármacos.
 - Adecuada identificación y manejo de las formas de llenado hacia los contenedores.
 - Identificación del producto con un número de lote o control para permitir conocer toda la historia del producto.
 - La inspección oportuna de las zonas donde se realiza el empaque, marcaje y embalaje del producto antes de iniciar estas actividades, para asegurarse que se cuentan únicamente con los materiales necesarios para ese producto, y evitar confusiones.
 - Todas las operaciones deben quedar registradas en la orden de producción.

- Al final de la operación debe revisarse para asegurar que se ha realizado adecuadamente, realizando el muestreo de las piezas estadísticamente para examen visual del correcto marcaje.
- Para asegurarse que el producto cumple estándares de identidad, fuerza, calidad y pureza durante su tiempo de uso, debe determinarse mediante pruebas de estabilidad, el tiempo durante el cual no sufre modificaciones de las características señaladas. Dicha estabilidad debe estar relacionada a ciertas condiciones de almacenaje.

h) ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN

- Deben existir procedimientos para describir las actividades de almacenamiento de fármacos, los cuales deben contar con un lugar para productos en cuarentena antes de ser liberados por la unidad de control de calidad, y almacenes que cuente con las condiciones adecuadas de temperatura, humedad, y luz, en donde la identidad, potencia, calidad y pureza no se vean afectadas.
- Deben existir procedimientos de distribución, los cuales incluyan un procedimiento donde se indique que los productos más viejos se distribuyan primero (Primeras Entradas - Primeras Salidas), y en caso que se requiera recuperar el producto este sea rápidamente localizado.

i) CONTROLES DE LABORATORIO

- Requerimientos generales.
- Control de calidad debe revisar y aprobar borradores para el establecimiento de especificaciones, estándares, planes de muestreo, procedimientos y métodos de prueba.
- Todos los requerimientos de GMP's deben seguirse y documentarse al momento en que se llevan acabo, registrando y justificando cualquier desviación.
- Se debe contar con los controles de laboratorio científicamente establecidos, además de especificaciones, estándares, paneles de muestreo, procedimientos de prueba. Todo debe estar diseñados para asegurar la identidad, pureza, potencia y calidad. Los controles de laboratorio deben contener:
 - Cumplimiento contra especificaciones escritas para la aceptación de cada lote de componentes, contenedores, cierres y etiquetas usadas en la manufactura, procesamiento, empaque o almacenaje.
 - Las especificaciones deben incluir una descripción del muestreo y análisis.
 - Las muestras deben ser representativas y adecuadamente identificadas.

- Cumplimiento contra especificaciones y descripción del muestreo y análisis de producto en proceso (Muestras representativas y debidamente identificadas), así como para producto terminado.
- Calibración de instrumentos de acuerdo a programas escritos que impliquen direcciones específicas, así como límites de precisión y exactitud. Acciones correctivas cuando sea necesario.
- El análisis y liberación para distribución.
 - Cada carga de producto terminado debe cumplir satisfactoriamente con las especificaciones incluyendo identidad y potencia de cada ingrediente activo antes de ser liberado.
 - Cada lote debe cumplir con las pruebas microbiológicas.
 - Los planes de muestreo y análisis deben estar indicados en procedimientos por escrito, así como los criterios de aceptación para análisis y muestreos, además de los controles estadísticos.
 - La exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos debe estar validada y documentada.
- Prueba de estabilidad
 - Debe existir un programa escrito para determinar la estabilidad de los productos, donde los resultados son usados para determinar las condiciones de almacenamiento y fechas de caducidad
 - El procedimiento debe incluir: tamaño de muestra e intervalo de muestreo basado en criterios estadísticos, en diferentes condiciones de almacenamiento, utilizando métodos de análisis confiables y utilizando el mismo tipo de contenedor que será utilizado para su embarque, con un número de lotes adecuados. Se pueden utilizar pruebas de estabilidad acelerada junto con estudios básicos de estabilidad.
- Requerimientos de pruebas especiales.
 - Para cada carga de producto que así lo requiera debe realizarse la Prueba de esterilidad y/o Endotoxinas Bacterianas con su respectivo procedimiento.
- Muestras de reserva
 - Deben existir muestras de reserva de cada embarque y de cada ingrediente activo, la muestra de reserva debe ser mínimo dos veces la cantidad necesaria para todas las pruebas analíticas, exceptuando la prueba de esterilidad y Pirogénos, tales muestras de reserva deben estar retenidas por un año posterior a la fecha de caducidad, además de existir un lugar adecuado para su almacenaje.

□ Animales de laboratorio

- Los animales de laboratorio usados en las pruebas de componentes, materiales en proceso, o fármacos deben cumplir con especificaciones, ser mantenidos y controlados en un lugar adecuado. Deben ser identificados, y tener cada animal su registro de comportamiento.

□ Contaminación por penicilina

- Existe la posibilidad de que productos no penicilínicos sufran contaminación cruzada con penicilina, por lo que a tales fármacos se les debe realizar pruebas de ausencia de penicilina, los resultados deben ser almacenados y conservados para cualquier duda.

j) REGISTROS, REPORTE

- Deben existir registros de producción, control y distribución específicamente asociados con lotes de fármacos los cuales deben ser retenidos al menos por un año después de la fecha de expiración del lote. Deben ser los reportes originales o en su defecto estar en copias o en algún otro medio, siempre que se cuente con los dispositivos necesarios para su lectura.

- Debe existir registros para limpieza de equipo mayor, mantenimiento y uso, demostrando los días, tiempo, producto y número de lote de cada embarque procesado.

- Deben existir registros de componentes, contenedores de producto, cierres y etiquetas. Los resultados de algunas pruebas o exámenes realizados y las conclusiones derivadas de lo anterior.

- Para asegurar la uniformidad entre lote y lote, el procedimiento maestro y los registros de control de cada producto, incluyen el tamaño del lote, deben ser preparados, fechados y firmados por una persona y verificarse, fecharse y firmarse por una segunda persona. El procedimiento maestro de producción y registros de producción deben incluir lo siguiente:

- El nombre y potencia del producto y una descripción de la forma farmacéutica.
- El nombre y peso o medida de cada ingrediente activo por unidad de dosis o por unidad de peso o medida del medicamento, estableciendo el peso total o medida del límite de dosis.
- Una lista completa de componentes designados por nombres o códigos suficientemente específicos para indicar alguna característica especial.
- Establecer un sistema de medición único.

- Establecer una descripción de los contenedores, cierres y materiales de empaque, incluyendo una muestra o copia de cada etiqueta y otra firmada y fechada por la persona responsable de aprobar tal etiqueta.
- Lote de producción y registros de control. Estos deben ser preparados por cada lote de medicamento y debe incluir información completa relacionada a la producción y control de cada lote.
- Revisión registros de producción. La producción de medicamentos y los controles de registros, incluyen los empaques y marcajes, deben ser revisados y aprobados por la unidad de control de calidad determinado la complacencia con todo lo establecido, aprobado en procedimientos escritos antes de liberar el lote.
- Registros de laboratorio. Estos deben incluir los datos completos derivados de todas las pruebas necesarias para asegurar complacencia con especificaciones establecidas y estándares, incluyendo exámenes y ensayos. Debe contener una descripción de la muestra recibida para prueba con identificación de fuente de donde se tomo, cantidad, numero de lote u otro código distintivo, datos de cuando fue tomada la muestra y de cuando fue recibida en el laboratorio para sus pruebas. Debe existir un registro de todos los datos obtenidos en el curso de las pruebas, incluyendo gráficas, cartas y espectro de los instrumentos de laboratorio, apropiadamente identificados para demostrar lo específico del componente, contenedor del producto, cierres, material en proceso, medicamento y lote examinado. Un registro completo debe mantenerse cuando se hacen modificaciones a los métodos empleados para análisis, especificando la razón del cambio. Deben mantenerse los registros de calibración así como de su periodicidad de instrumentos de laboratorio y aparatos.
- Los registros de Distribución. Estos deben contener el nombre y potencia del producto así como la descripción de la forma farmacéutica, nombre y dirección del consignado, fecha y cantidad del embarque, y el numero de lote o control del fármaco.
- Archivos de quejas. Deben existir procedimientos que describan el manejo de todas las quejas escritas y orales relativas a un producto, debiendo registrarla y darle un seguimiento. Tales procedimientos incluyen provisiones para la revisión por la unidad de control de calidad. Los registros deben mantenerse mínimo un año después de la fecha de expiración del producto.

k) DEVOLUCIONES

- La devolución de los productos debe ser identificado como tal. Los registros de devoluciones deben ser mantenidos y deben incluir el nombre y etiquetado de potencia del fármaco en la forma farmacéutica, número de lote, razón de la devolución, cantidad devuelta, datos de disposición y última disposición del producto.
- Los productos que han sido sujetos a condiciones de almacenaje inadecuados como temperatura extrema, humedad, humo, presión, edad o radiación debido a desastre natural, fuego o accidente, o a equipo en falla no debe ser reutilizado ni retornados a la fuente de venta.

ANEXO IV

**CLASIFICACIÓN DE PARTÍCULAS EN AIRE EN
CUARTOS LIMPIOS Y ZONAS LIMPIAS
Federal Standard 209E**

September 11, 1992

Nombre Clase		Límite de clase									
		0.1 μm unidades de volumen		0.2 μm unidades de volumen		0.3 μm unidades de volumen		0.5 μm unidades de volumen		5 μm unidades de volumen	
SI	Inglés	(m ³)	(ft ³)	(m ³)	(ft ³)						
M 1		350	9.91	75.7	2.14	30.9	0.875	10	0.283	-	-
M 1.5	1	1240	35	265	7.5	106	3	35.3	1	-	-
M 2		3500	99.1	757	21.4	309	8.75	100	2.83	-	-
M 2.5	10	12400	350	2650	75	1060	30	353	10	-	-
M 3		35000	991	7570	214	3090	87.5	1000	28.3	-	-
M 3.5	100	-	-	26500	750	10600	300	3530	100	-	-
M 4		-	-	75700	2140	30900	875	10000	283	-	-
M 4.5	1000	-	-	-	-	-	-	35300	1000	247	7
M 5		-	-	-	-	-	-	100000	2830	618	17.5
M 5.5	10 000	-	-	-	-	-	-	353000	10000	2470	70
M 6		-	-	-	-	-	-	1000000	28300	6180	175
M 6.5	100 000	-	-	-	-	-	-	3530000	100000	24700	700
M 7		-	-	-	-	-	-	10000000	283000	61800	1750

This Standard is approved by the COMMISSIONER, Federal Supply Service, General Services Administration, for the use of all Federal agencies.

ANEXO V

Procedimiento de operación

Verificación de velocidades de flujo en el área de pruebas de esterilidad.

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento para realizar la verificación de las velocidades de flujo en los filtros HEPA.

2. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable para la determinación de la velocidades de flujo de los Filtros HEPA que se encuentran en el Area de Pruebas de Esterilidad.

3. REFERENCIAS

CFR 211.46

NOM -059-SSA1-1993. Cap. 12 parrafo12.5.4.4

Carlton and Agalloco; Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes; [De VECCHI; Validation of Air Systems Used In Parenteral Drug Manufactures Facilities] ; MARCEL DEKKER , USA 1986 .

4. PROCEDIMIENTO

Material y equipo

Uniforme estéril.

Anemómetro calibrado Air Flow de cabeza de hélice.

Marcador indeleble

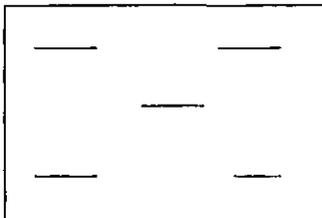
Piseta con sanitizante (etanol al 70 % o Cloruro de Benzalconio al 5%)

PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN.

Ingresar al área de Pruebas de Esterilidad, según procedimiento vigente.

Una vez en el área de paneles se procede a la medición de la siguiente manera:

El panel esta compuesto de filtros, cada filtro es dividido en 5 zonas para la medición como se muestra en la siguiente fig.



Zonas de medición en el panel.

Encender el anemómetro y colocar el interruptor en la escala del sistema Internacional, así como el parámetro de velocidad.

Colocar el anemómetro e iniciar la toma de la velocidad, la lectura deberá permanecer constante por 20 segundos, esta es la lectura que se registra.

Realizarlo tres veces la operación anterior en el mismo punto, y obtener el promedio. Reportar el promedio de las lecturas de cada punto en el formato correspondiente, obteniendo además el promedio de velocidad por Filtro HEPA, así como el coeficiente de variación por filtro HEPA. --

Posteriormente obtener el promedio por banco de filtración,

El calculo del Flujo de aire por banco de Filtración es como sigue.

- $Q = \text{Velocidad promedio} * \text{área de filtración}$.
- Las unidades del flujo están dadas en m^3/h .
Donde Q es el Flujo de aire por banco de Filtración.
- Multiplicar la velocidad promedio del banco de Filtración por el área de filtración del panel de filtros.
- Posteriormente calcular el Número de cambios de aire por hora.
- $\text{CAH} = Q / \text{Volumen de la habitación}$.
Volumen de la habitación es 27.70 m^3
- Si alguno de los puntos anteriores no cumple con las especificaciones, realizar las acciones correctivas.
- Esta actividad debe realizarse por lo menos cada quince días.

Especificaciones

La velocidad promedio por filtro HEPA deberá ser de $0.45 \text{ m/s} \pm 20\%$ ($0.36 - 0.54 \text{ m/s}$)

La diferencia de velocidades dentro de un mismo filtro no deberá ser mayor al 25%.

El número de recambios de aire por hora no deberá ser menor a 20.

Ejemplo práctico

A continuación se mencionan algunos datos para comprender mejor el uso de las fórmulas anteriormente indicadas.

El panel de Filtración del Área de Pruebas de Esterilidad esta conformado por 6 filtros HEPA de 24" * 24" * 4" con marco de gel y sello de aluminio quedando de la siguiente forma:

F1	F2	F3
F4	F5	F6

Filtros HEPA en área de pruebas.

Resultados promedios de cada punto.

PUNTOS	1	2	3	4	5	Promedio	Des. Est.	Coef. Var.
Filtro 1	0.45	0.45	0.51	0.47	0.45	0.466	0.026077	5.5958818 9
Filtro2	0.41	0.43	0.45	0.41	0.47	0.434	0.026077	6.0084814 8
Filtro 3	0.41	0.43	0.49	0.45	0.45	0.446	0.029665	6.6512990 9
Filtro 4	0.43	0.45	0.43	0.43	0.41	0.430	0.014142	3.2888687 5
Filtro 5	0.51	0.51	0.43	0.47	0.49	0.482	0.033466	6.9432367 3
Filtro 6	0.49	0.49	0.49	0.49	0.43	0.478	0.026833	5.6135597 8
						promedio total	0.456	m/seg.

Velocidad promedio del banco de filtración son 0.456 m/seg. lo que dan 1641.6 m/h .

Área son 48" * 48" equivale a :

1 in 2.54 cm
48 in 121.92 cm

100 cm 1 m
121.92 cm 1.2192 m

Área filtro 1.486449 M²
Área banco 8.918692 M²

□ $Q = \text{Velocidad promedio (m/ h)} * \text{área de filtración (m}^2\text{)}$.

$$Q = 1641 \text{ m/h} / 8.92 \text{ m}^2 = 14640.9245 \text{ m}^3 / \text{H}$$

Posteriormente calcular el número de recambios de aire por hora.

□ $\text{CAH} = Q / \text{Volumen de la habitación}$.

$$\text{Volumen de la habitación es } 27.70 \text{ m}^3$$

$$\text{CAH} = 14640.9245 \text{ m}^3 / \text{H} / 27.70 \text{ m}^3$$

$$\text{CAH} = 528.553232$$

5. RESPONSABILIDADES

De los analistas la correcta y completa realización de este procedimiento, así como informar de cualquier desviación en las especificaciones.

Realizar las adecuaciones necesarias según la información que se genere en Normatividades internacionales.

De la jefatura verificar la completa y correcta capacitación de este procedimiento.

ANEXO VI

Borrador de un memorandum donde se reporta la identificación de un microorganismo cuando no se utiliza Kit de Identificación

PARA: Jefe de Control de Calidad.

fecha xx/xx/xxxx

DE: analista

ASUNTO: IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN ÁREAS ASEPTICAS.

ÁREA ASEPTICA II

FECHA: 13-07-98

PROCEDIMIENTO: CONTACTO EQUIPOS PAREDES Y PERSONAL

ZONA : UNIFORME Y GUANTES OPERADOR UNO

ANALISTA: JOSE EDUARDO VILLAGOMEZ

HORA: 09:05 11:05

SANITIZANTE: CHR CONC: 1 % /BENZALCONIO 200 ml/ CONC. 10% lts

En base a la tinción Gram positiva, morfología microscópica bacilar (con endospora) y a la prueba de catalasa positiva se determinó que este microorganismo pertenece al género *Bacillus*, distinguiéndose claramente del género *Clostridium*, por ser aerobio. Se presenta el siguiente perfil de comparación para apreciar las semejanza de resultados con el género *Bacillus*:

PERFIL	COLONIA DESCONOCIDA	<i>Bacillus</i> licheniformes	<i>Bacillus pumilis</i>
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Bacilos Gram positivos	Bacilos Gram positivos	Bacilos Gram positivos
FORMACIÓN DE ESPORA	Subterminal	1	1
FORMA DE ESPORA	Oval	1	1
CATALASA	+	+	+
OXIDASA	-	No reportado	No reportado
INDOL	-	-	-
MOTILIDAD	+	+	+
CITRATOS	+	+	+
CRECIMIENTO EN NaCl 7%	+	+	+
CARBOHIDRATOS ACIDO DE:			
SACAROSA	+	No reportado	No reportado
MALTOSA	+	No reportado	No reportado
GLUCOSA	+	+	+
ARABINOSA	+	+	+
LACTOSA	+	No reportado	No reportado

1. Indica el numero de grupo morfológico al que pertenece dicha especie, en el cual se especifica, Bacilos con espora central o Subterminal, espora oval o esférica, cuerpo bacilar ensanchado o no.

De acuerdo con lo anterior se cuenta con el perfil suficiente para indicar el género de este microorganismo, pero no con el suficiente para señalar la especie del mismo, por lo tanto se considera dicho microorganismo como :

Bacillus spp

Generalidades:

Las especies de *Bacillus* son en su mayor parte Saprofíticas ampliamente distribuidas en la naturaleza, particularmente en aceites, donde son propagadas en polvo, agua y materiales de origen animal y vegetal. La sobrevivencia durante la distribución resulta de la resistencia de las esporas a las condiciones adversas. El amplio rango de las características fisiológicas exhibidas de este género esta reflejado en un amplia variedad de variantes facultativas de especies de mesófilos, termofilos facultativos y obligados psicofilos acidofilos, halofilos, siendo capaces de sobrevivir y crecer a temperaturas extremas, pH, salinidad, en donde muchos otros microorganismos son inhibidos o mueren.

La mayoría de la especies de *Bacillus* aparentemente son potencialmente poco o nada patógenos, y son raramente asociados con enfermedades en humanos o animales inferiores; excepto la más conocida que es ocasionada por el *B. anthracis*.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier duda o aclaración.

ATTE.

QUIMICO ANALISTA

Bibliografía

P.C. B. Turnbull. J.M. Kramer, **BACILLUS** , MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 5a, Ed. USA , 1991.



BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

1. GUÍA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA FARMACEUTICA, 3a. Ed., COMISIÓN INTERINSTITUCIONAL DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA PARA LA INDUSTRIA FARMACEUTICA A.C., México 1989.
2. NOM -059-SSA 1-1993 BUENAS PRACTICAS DE FABRICACION PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO-FARMACEUTICA. Cap. 12, México,1995.
3. NOM-060-SSA1-1993 REGULACIÓN SANITARIA PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUIMICO-FARMACÉUTICA ;Cap. 8, México,1995
4. 21 CFR , Parte 211 – CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICE FOR FINISHED PHARMACEUTICALS. F.D.A ; EE.UU., 1992
5. ISO 9002, Curso Sistema de Calidad, Gist-brocades IPM, marzo 1998.
6. Becerril O. A., TEORÍAS DE LA ORGANIZACIÓN EN ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, CALIDAD TOTAL, U. V. M., México 1999.
7. Lamprecht L.J., ISO 9000 PREPARING FOR REGISTRATION, Marcel Dekker, New York, 1992 .
8. NMX-CC-001: 1995 IMNC [ISO-8402:1994] ADMINISTRACIÓN DE LA CALIDAD Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD. VOCABULARIO
9. Tabla G. , GUÍA PARA IMPLANTAR LA NORMA ISO 9000, Edit: MCGRAW-HILL, MÉXICO, 1998.
10. Carleton and Agalocco; Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes; [De VECCHI; Validation of Air Systems Used In Parenteral Drug Manufactures Facilities]; MARCEL DEKKER , USA 1986.

11. Lacchman, and Lieberman, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: PARENTERAL MEDICATIONS VOL.1, [Keller A.; Environmental Factors in the Design of Parenteral Production Facility] ; MARCEL DEKKER , USA 1984.
12. FEDERAL STANDARD No. 209E , AIRBORNE PARTICULATE CLEANLINESS CLASSES IN CLEANROOMS AND CLEAN ZONES, September 15, 1988
13. FUNDAMENTALS OF A MICROBIOLOGICAL ENVIROMENTAL MONITORING PROGRAM, TECHNICAL REPORT No. 13, PDA ENVIROMENTAL TASK FORCE, Volume 44 Number S1, Supplement 1990, pp .
14. Ljungqvistb and Reinmuller B., INTERACTION BETWEEN AIR MOVEMENTS AND THE DISPERSION OF CONTAMINANTS: CLEAN ZONES WITH UNIDIRECTIONAL AIR FLOW; Journal Parenteral Science & Technology, VOL. 47, No 2 / MARCH – APRIL 1993.
15. Sharp J. REGLAS DE CALIDAD, MANUFACTURA DE PRODUCTOS ESTERILES, Edit. Interpham Consulting LTD., México, 1992
16. Wood T.R., MICROBIOLOGICAL QUALITY ASSURANCE FOR PHARMACEUTICAL PRODUCTS, [ENCUENTRO INTERNACIONAL DE CALIDAD FARMACEUTICA, AFM], 1996.
17. Lacchman, and Lieberman, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: PARENTERAL MEDICATIONS VOL.1, [Luna C. ; Personnel: The Key Factor in Clean Room Operations]; MARCEL DEKKER , USA 1984.
18. Wesley A. Volk, MICROBIOLOGIA BÁSICA, 7a. Ed., Edit. Harla, México 1996.
19. Atlas R.M., MICROBIOLOGY, FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS; Interaccions Between Microorganisms and Humans, 2a. Ed. Mac Millan, 1988