

24.22



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**FACTORES QUE AFECTAN LA CARGA MICROBIANA
PREESTERIL DE UNA SOLUCION ELECTROLITICA
ORAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

FRANCISCO JAVIER MONTOYA MENDOZA

MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

	Pág
I. INTRODUCCION.	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV. OBJETIVO	30
V. HIPOTESIS	31
VI. MATERIALES Y EQUIPO	32
VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
VIII. RESULTADOS	40
IX. EVALUACION DE RESULTADOS	50
X. CONCLUSIONES	52
XI. PROPUESTAS	53
XII. BIBLIOGRAFIA	54

I. INTRODUCCION

El control de factores que afectan un proceso de fabricación de un medicamento estéril constituyen un aspecto primordial del mismo, es un hecho que no se puede garantizar la calidad de un producto aunque se posean la maquinaria y áreas más sofisticadas (1), por lo tanto resulta imperativo conjugar los esfuerzos de todas las personas que intervienen en la elaboración y control de productos que por el destino que tienen en el ser humano deben apegarse a las normas más rigurosas de control de calidad.

Es importante señalar que elaborar un medicamento estéril para uso público es una gran responsabilidad, de ahí la importancia del aseguramiento de la calidad en el proceso de elaboración, convirtiéndose esto en un motivo de preocupación del fabricante si consideramos que en la actualidad los productos se consumen a gran escala.

El control microbiológico de un proceso de fabricación de un producto estéril, tiene por objeto minimizar la contaminación de un proceso, asignando causas posibles a los problemas encontrados, así como el seguimiento y la solución final de los mismos, tomando las medidas pertinentes para que este problema no se repita en lo sucesivo.

El aseguramiento de la calidad en un proceso puede realizarse de diversas formas, esto está dado en base al tipo de proceso, así como a las consideraciones que se pueden hacer para determinar las etapas críticas que deben evaluarse para garantizar la calidad del producto.

El garantizar la calidad de un producto implica diversos aspectos, el presente trabajo se ocupará del aspecto microbiológico en el proceso de fabricación de una solución oral estéril.

Al fabricar un producto estéril, se observa que todos los factores que circundan el proceso de fabricación repercuten sobre la calidad del mismo. Sin embargo se puede realizar una clasificación de estos factores como los inherentes al proceso y los microbiológicos.

Dentro de los factores microbiológicos se pueden establecer, los que se pueden mantener bajo control y los que tienen cierta probabilidad de ocasionar algún problema.

El objetivo de este trabajo se encamina al estudio de los factores mencionados anteriormente en segundo término.

Las características del proceso bajo estudio y el análisis de las etapas de fabricación del mismo, conducen a determinar las etapas críticas desde el punto de vista microbiológico.

Estas etapas no se pueden llevar a nivel producción de

bido a su alto costo, sin embargo podemos simular condiciones críticas tanto en la etapa de llenado como en la de recirculación a través de luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos del estudio dan recomendaciones para observar en estas dos etapas del proceso de fabricación para asegurar la calidad del producto.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

- II.1. AREA ESTÉRIL
- II.2. DISEÑO DEL ÁREA ESTÉRIL
- II.3. CLASIFICACIÓN DEL ÁREA ESTÉRIL
- II.4. CONTROLES DEL ÁREA ESTÉRIL
- II.5. EL UNIFORME
- II.6. NORMAS DE OPERACIÓN PARA LABORAR EN
ÁREA ESTÉRIL
- II.7. SANITIZACIÓN
- II.8. ESTERILIZACIÓN
- II.9. CONTAMINACIÓN MICROBIANA
- II.10. LÍMITES DE ACCIÓN Y LÍMITES DE ALERTA

II.1. Area estéril

Es un área cerrada con características de diseño y funcionalidad especiales, sobre la cual se emplean controles -- que siguen los estándares más estrictos en cuanto a:

1. Material particulado. Mantener la contaminación -- dentro de límites.
2. Control microbiológico. Deberá mantenerse dentro - de las especificaciones.
3. Temperatura. Recomendada 22.2°C (72°F)
4. Humedad relativa. Recomendada 40% ± 5%.
5. Velocidad del aire. Recomendada 90 ± 20 pies/minuto.
6. Presión positiva. Mínima entre el área de trabajo- y otras áreas.
7. Volumen de aire. Recomendado 30 pies³/minuto/perso-
na.
8. Nivel de ruido. De acuerdo a las normas marcadas - por las autoridades locales.

II.2. Diseño del área estéril

Las regulaciones oficiales no especifican requerimiento exacto en cuanto a composición, únicamente marcan caracterís- ticas de los atributos físicos de las superficies y tamaño - del área (1).

La FDA establece:

1. El tamaño debe ser el adecuado.
2. La localización del área debe facilitar la limpieza, mantenimiento y operaciones.
3. Los pisos, paredes y techos deben ser lisos.
4. Las superficies deben ser de fácil limpieza e impermeables al agua.
5. Los materiales empleados en el acabado deben ser resistentes al despostillamiento, descascaramiento, oxidación y otros deterioramientos.
6. Las uniones pared-pared, techo-pared y piso-pared - deben ser curvas, para facilitar las operaciones de limpieza.

Las clases de área estéril empleadas para fabricar productos estériles se muestran en la tabla 1.

CLASES DE AREA ESTERIL

Clase en el sistema inglés (sistema métrico*)	Máximo número de partículas por pie cúbico (por litro*) de -- 0.5 micras y mayores.	Promedio de partículas viables por pie cuadrado por semana-- (por metro cuadrado-- por semana*).	Número mínimo de recambios por hora para conservar la clase de área.
100 (3.5*)	100 (3.5*)	1,200 (12,900*)	600
10,000 (350*)	10,000 (350*)	6,000 (64,600*)	50-60
100,000 (3500*)	100,000 (3500*)	30,000 (323,000*)	30-40

Tabla 1. Clases de áreas asépticas de acuerdo al número de partículas que permiten por unidad de volumen. Según Federal Standar 209 B.

II.3. Clasificación del área estéril⁺

Clase 100 (3.5). El número de partículas no debe exceder de un total de 100 partículas por pie cúbico (3.5 partículas por litro) de un tamaño de 0.5 micras o mayores.

Clase 10,000 (350). El número de partículas no debe exceder de un total de 10,000 partículas por pie cúbico (350 - partículas por litro) de un tamaño de 0.5 micras o mayores, o 65 partículas por pie cúbico (25 partículas por litro) de un tamaño de 5 micras o mayores.

Clase 100,000 (3500). El número de partículas no debe exceder de un total de 100,000 partículas por pie cúbico - - (3500 partículas por litro) de un tamaño de 0.5 micras o mayores, o 700 partículas por pie cúbico de un tamaño de 5 micras o mayores.

II.4. Controles del área estéril

Controles microbiológicos. Estos controles proporcionan información acerca de la seguridad con la que podemos -- trabajar en el área, verificando calidad microbiológica del ambiente, eficiencia del proceso de sanitización, así como - el control de personal y área.

Para realizar esto, es necesario seleccionar los puntos de muestreo, esto se hace en base a:

⁺ Según Federal Standard 209 B (19).

1. Diseño del sistema y equipo.
2. Facilidad del muestreo.
3. Período de trabajo.
4. Representatividad.

Métodos empleados

1. Método de sedimentación en placa. En estas pruebas se colocan las cajas Petri conteniendo Agar Soya Trypticaseí na expuestas un período determinado de tiempo en el punto de muestreo, posteriormente se incuban por 72 horas a 30-35°C.- Los microorganismos presentes en el aire se sedimentan en el agar.

2. Método de impactación en agar. En este método se impacta un volumen determinado de aire sobre la superficie de una placa rotatoria de agar, el volumen de impactación es de un pie por minuto. Posteriormente las placas con agar se incuban durante 72 horas a 30-35°C.

3. Muestreo de superficies por el método de Hisopo de Swab. En esta prueba se utiliza un hisopo estéril con el que se muestrea una superficie de 25 centímetros cuadrados, este muestreo se realiza frotando el hisopo estéril humedecido en solución de citrato de sodio estéril, posteriormente se introduce el hisopo en un tubo de ensaye que contenga solución de citrato de sodio estéril, se homogeneiza y vierte en una placa conteniendo agar estéril sin solidificar, homogeneizar dejando solidificar e incubar a 30-35°C durante 3 días.

4. Muestreo de superficies mediante placas Rodac. Esta prueba se efectúa con placas de contacto, las cuales son semejantes a las cajas Petri, éstas contienen un medio de cultivo sólido que posee una superficie convexa, la superficie del medio se presiona ligeramente sobre la superficie de prueba. Las placas se incuban a 30-35°C durante 3 días. Es conveniente realizar una limpieza en la superficie de muestreo debido a que los residuos del medio que quedan en la superficie de muestreo son una fuente potencial de contaminación.

Controles físicos

1. Conteo de material particulado. Esto se realiza mediante un contador de partículas (8).

2. Verificación de flujo laminar. Esta prueba se realiza con tetracloruro de titanio, se rompe la ampollita y se acerca al panel de flujo laminar, se observa la trayectoria del gas y se determina si existe flujo laminar o no.

3. Eficiencia relativa de filtros HEPA. Se utiliza para determinar la eficiencia relativa de filtros HEPA y sus instalaciones, mediante el DOP que es un compuesto químico seco que puede ser aerosolizado a un tamaño de partícula uniforme de 0.3 micras de diámetro. Cuando se agrega bajo presión por la parte posterior del sistema de filtración HEPA, el DOP puede detectarse por la parte frontal usando un espectrofotómetro. Por definición un filtro HEPA puede eliminar-

el 99.97% de partículas mayores o iguales a 0.3 micras.

II.5. El uniforme

El ser humano se puede considerar como una fuente de -- contaminación, debido a que está contribuyendo con partícu- las y microorganismos al medio ambiente; por esta razón es - necesario evitar que las personas que laboren en área esté- ril contribuyan a la contaminación.

Para este efecto es necesario dotar al personal de un - uniforme que posea las siguientes características:

- a. Estar fabricado con materiales que no liberen partí- culas o que liberen muy pocas partículas, así como- que no generen electricidad por rozamiento.
- b. Debe ser holgado.
- c. Debe cubrir el cuerpo por completo sin impedir la - visión y respiración, para lo cual debe constar de:

Cubrepelo
Cubreboca
Capucha
Overol
Guantes
Zapatones
Botas
Gafas o Careta
Visera

- d. Debe ser limpio y estéril.

II.6. Normas de operación para laborar en área estéril

Para garantizar el producto que se fabrica en un área - estéril es necesario que el personal que elabora el producto dentro de esta área siga como mínimo los siguientes puntos:

1. El personal que ingrese al área estéril debe tener conocimiento pleno de la función que va a desempeñar en ella, así como los lineamientos que deben obedecerse para trabajar en este sitio.

2. El personal debe conocer como atender las siguientes emergencias.

- a). Incendio
- b). Explosión interna o externa
- c). Fallas en la corriente eléctrica
- d). Ruptura de garrafones que contengan tanto materiales tóxicos como no tóxicos.

3. El personal debe conocer la forma de usar el uniforme para el área estéril, así como usarlo mientras permanezca en ella.

4. El personal debe conocer las técnicas de desinfección necesarias para mantener el ambiente estéril.

5. Una vez dentro del área de trabajo se saldrá únicamente al término de la jornada de trabajo.

6. Para la entrada y salida de materiales se deben utilizar los sitios destinados para este fin.

7. Si por algún motivo se tuviera que salir del área, al reingreso se debe usar otro uniforme que esté limpio y estéril.

8. El número de personas en el vestidor debe reducirse al mínimo, tanto a la entrada como a la salida.

9. El personal enfermo (especialmente de las vías respiratorias) o en período menstrual debe abstenerse de trabajar dentro del área estéril.

10. La comunicación al exterior debe hacerse por el sistema de intercomunicación.

11. Las puertas de acceso al área estéril deben permanecer cerradas todo el tiempo, abriéndose y cerrándose sólo para permitir el paso de una persona a la vez.

12. No deben introducirse alimentos, ni fumar dentro del área.

13. Se debe evitar el uso de cosméticos (polvos y cremas), barniz de uñas y spray para el cabello, así como el uso de pulseras, anillos, cadenas y relojes.

14. El personal debe conocer las obligaciones específicas de limpieza del área para que al término de la jornada de trabajo quede ordenada y limpia.

15. Todo material que se introduzca en la zona estéril deberá ser esterilizado previamente, cuando se introduzca --

equipo que no pueda ser esterilizado, deberá limpiarse y sanitizarse perfectamente.

16. Se debe evitar el uso de escobas, jergas u otros materiales que arrojen contaminantes biológicos o desprendan material particulado.

17. La entrada de papel o cartón al área debe ser restringida y limitada.

18. Para escribir se debe usar bolígrafo o plumón delgado de plástico, evitándose el uso de borradores y lápices.

19. Debe existir un calendario de desinfección y limpieza así como registros que indiquen fecha y desinfectante-utilizado.

20. Las sillas que se introduzcan al área estéril deben de ser de plástico con base metálica.

21. Todos los productos y materiales deberán estar perfectamente identificados.

II.7. Sanitización

Es el proceso en el cual son eliminados los microorganismos de las superficies de los materiales, equipos e instalaciones (mediante el uso de detergentes, germicidas o radiaciones ultravioleta).

En la tabla 2 se presentan los germicidas más comúnmente utilizados.

Los germicidas se ven afectados en su actividad por diversos factores, algunos de ellos son:

- pH. La afinidad desinfectante-célula puede ser rota por cambios de pH.
- Materia orgánica. La materia orgánica presente reduce la actividad del germicida descomponiéndolo o absorbiéndolo.
- Concentración. La actividad se puede caracterizar de acuerdo a la concentración.
- Tiempo de exposición. Es necesario que el germicida esté en contacto con los microorganismos por un tiempo determinado.

Mecanismo de acción de los desinfectantes. El mecanismo de acción de los desinfectantes empleados para sanitizar, implica una interacción entre el agente sanitizante y el microorganismo, esto es:

Interacción primaria germicida-célula.

- Cambios en la velocidad electroforética de la célula.

Interacción secundaria germicida-célula

- Modificación de la permeabilidad celular y escape de los constituyentes celulares.
- Efectos generales sobre el metabolismo.

Descontaminante (Germicida)	Concentración normal efectiva por unidad de tiempo.	Efectos bactericidas sobre células vegetativas	Efectos sobre esporas	Otras observaciones
Compuestos fenólicos	1 a 5%/10 minutos	Muy efectivo	Elevando la temperatura aumenta su efectividad sobre hongos y esporas bacterianas.	1. Ejemplos: vesphene, lysal. 2. No se contra-- rresta por ma--teria orgánica.
Alcoholes (etílico o amílico)	70 a 90%/10 min	Muy efectivo	Pequeño o sin efecto sobre hongos o esporas bacterianas.	1. 70% v/v es mejor. 2. El alcohol puede contener -- agua disminu--yendo la actividad.
Compuestos iodados	10 a 25 ppm de iodo libre/1 minuto.	Muy efectivo Buen fungicida	Tiene efecto a pH ordinario	Neutralizado por algunos compues--tos orgánicos. Ej. Wescodyne.
Compuestos cuaternarios de amonio	1 a 3%/10 minutos.	No efectivo para algunos Gramnegativos y organismos con ácidos -- grasos	No efectivo	Ejemplo: Roccal.
Compuestos clorados	4 a 1000 ppm/0.5 a 70 minutos	No efectivo para microorganismos con ácidos grasos.	Efectivo en pH neutro o ligeramente ácido	El hipoclorito puede ser más efectivo combinado con otros compuestos químicos. El efecto está dado por formación de ácido hipocloroso.

Tabla 2. Características de los diferentes grupos de germicidas

Agentes	Condiciones	Observaciones y Limitaciones
1. FISICOS		
- Calor húmedo	121°C, 15 a 20 minutos	Las variaciones en tiempo y temperatura son útiles. Para materiales permeables al vapor pero no dañados por él.
- Calor seco	160°C, 2 horas	Son aceptadas otras combinaciones de tiempo y temperatura.
- Radiación U.V	25°C, 800 microwatts por minuto centímetro cuadrado.	Poca penetración, limitado a superficies limpias y al aire.
2. QUIMICOS		
- Oxido de etileno	25°C, 30% de humedad relativa, 8 a 16 horas	No penetra en sólidos, se absorbe en plásticos y gomas, requiere completa aereación debido a su toxicidad.
- Spray de ácido paracético	25°C, 2% con 0.1% de surfactante, 20 min.	Corroe metales.
- Vapor de formaldehído	25°C, humedad relativa mayor a 80%.	El formaldehído polimeriza en superficies, requiere aereación.
- B*propiolactona.	25°C, 10%, 10 minutos, humedad relativa mayor a 70%.	Vapores irritantes, requiere aereación, debido a su toxicidad.
- Hipoclorito de sodio	25°C, 500 a 5000 ppm con 1% de surfactantes, 5 min.	Corroe muchos metales
- Formalina	25°C, 10%, 10 minutos	Vapores irritantes

Tabla 3. Métodos físicos y químicos de esterilización

- Coagulación general reversible del citoplasma.
- Lisis.

II.8. Esterilización

Esterilización es un término absoluto que comprende la destrucción o eliminación total de cualquier clase de vida microbiana.

Los procesos de esterilización en la industria farmacéutica son de gran interés, a estos procesos los podemos agrupar en dos categorías, químicas y físicas como se presenta en la tabla 3.

II.9. Contaminación microbiana

Es la ocurrencia y persistencia de microorganismos en ambientes controlados, donde no se necesita su presencia, deterioran el producto y le confieren a éste la actividad de sus desechos metabólicos. Se denomina bioburden a la contaminación microbiana presente en un área o ambiente de trabajo.

La contaminación microbiana de un área está directamente relacionada con el medio ambiente, actividad y densidad de personal.

Las fuentes de contaminación se pueden agrupar en dos categorías:

- a). Humanas
- b). Ambientales

La diversidad de microorganismos que éstas presentan se muestra a continuación.

Flora microbiana que prevalece en varias áreas del cuerpo.

- a. Cabello
 - Staphylococcus spp
 - Corynebacterium spp
 - Bacilos grampositivos
- b. Oídos
 - Staphylococcus spp
 - Corynebacterium spp
 - Bacillus spp
 - Bacilos grampositivos
- c. Ojos
 - Staphylococcus spp
 - Micrococcus spp
 - Bacilos grampositivos
- d. Nariz
 - Staphylococcus spp
 - Corynebacterium spp
 - Penicillium spp
 - Bacilos grampositivos
- e. Boca
 - Straptococcus spp
 - Staphylococcus spp
 - Neisseria spp
 - Corynebacterium spp

- f. Garganta
 - Streptococcus spp
 - Staphylococcus spp
 - Neisseria spp
 - Lactobacillus spp

- g. Antebrazo
 - Staphylococcus spp
 - Bacillus spp
 - Lactobacillus spp
 - Corynebacterium spp

- h. Mano
 - Staphylococcus spp
 - Bacillus spp

Microorganismos comúnmente aislados en diferentes ambientes por varias compañías farmacéuticas.

- a. Aire
 - Bacillus spp
 - Clostridium spp
 - Staphylococcus spp
 - Streptococcus spp
 - Penicilium spp
 - Aspergillus spp
 - Rhodotorula spp

- b. Agua potable
 - Pseudomona spp
 - Alcaligenes spp
 - Flavobacter spp
 - Serratia spp

c. Agua de lluvia en el suelo

- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus megaterium*
- *Klebsiella aerogenes*
- *Enterobacter* spp

d. Agua de desecho

- *Proteus* spp
- *E. coli*
- *Streptococcus* spp
- *Clostridium* spp

e. Material

- *Erwinia* spp
- *Pseudomona* spp
- *Streptococcus* spp
- *Lactobacillus* spp
- *Bacillus* spp
- *E. coli*
- *Cladosporium* spp
- *Alternaria* spp
- *Fusarium* spp

f. Material de empaque

- *Bacillus* spp
- *Micrococcus* spp
- *Penicillium* spp
- *Aspergillus* spp
- *Clodosporium* spp

g. Edificios

- *Aurobasidiomicetos* spp

II.10. Límites de acción y límites de alerta

Una forma de medir la efectividad de los controles de proceso ambiental, es evaluarlos rutinariamente, utilizando como indicador límite de acción y límite de alerta, ambos apropiados al tipo de producto y su proceso de manufactura.

Es importante hacer notar en el uso de los límites de acción, que una desviación no necesariamente implica que la calidad del producto es afectada.

Los límites de acción no son límites de aceptación o de rechazo. En la mayoría de los casos, la acción tomada es la de ajustar un proceso o un sistema de control, a un predeter~~minado~~ modo de operación.

Estos límites se pueden definir de la siguiente manera:

Límites de alerta. Son niveles o rangos que indican, cuando no se cumplen, una alteración potencial de las condiciones normales de operación pero que no necesariamente requieren de una acción correctiva.

Límites de acción. Son niveles o rangos que indican, cuando no se cumplen, una alteración de las condiciones normales de operación, y la cual requiere de la toma de una acción correctiva.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como parte del programa de aseguramiento de la calidad en la fabricación de la solución electrolítica estéril, se sometió el proceso a condiciones críticas para determinar sus parámetros de control.

A menudo cuando se habla de someter un proceso de llenado aséptico a un reto microbiológico, comúnmente se asocia con una serie de pruebas que consisten en un llenado de medio nutritivo, sin embargo el enfoque que se puede dar a un proceso para determinar la capacidad que posee para producir un producto de buena calidad desde el punto de vista microbiológico es muy amplio, esto va de acuerdo al proceso y a la compañía de la que se trate.

La solución electrolítica estéril que se fabrica mediante este proceso contiene Dextrosa entre sus componentes, ésta en solución se puede considerar un medio que favorece el crecimiento de microorganismos, de acuerdo a esto es necesario seleccionar microorganismos que tengan su habitat natural en el agua.

El proceso estudiado se puede describir de la siguiente manera (Diagrama 4).

El agua empleada para la preparación de la solución electrolítica es obtenida de un pozo, pasada a una cisterna donde se clora para asegurar su potabilidad, el agua de la cisterna se pasa por un filtro de carbón en donde se elimina el cloro y materia orgánica, posteriormente pasa a un desionizador, continuando su paso a través de una lámpara de luz ultravioleta para depositarse en un tanque de preparación de soluciones. En esta etapa se realiza la preparación de la solución, para posteriormente pasar por filtros de 1.5 micras y lámpara de luz ultravioleta, para enviarse después a las máquinas dosificadoras BFS en donde se forma la botella, se llena de inmediato con la solución filtrada previamente por membrana de 0.45 micras y se sella la boca de la botella para posteriormente esterilizarse por agua sobre calentada en autoclave.

De acuerdo a las características que presenta este proceso, existen dos etapas que se pueden considerar críticas, una de ellas es la eficiencia que poseen las lámparas de luz ultravioleta para disminuir la carga bacteriana, la otra es la etapa de llenado en donde el producto queda expuesto al medio ambiente, transcurriendo un período de tiempo entre el llenado y su esterilización final (Diagrama 1, 2 y 3).

Es importante considerar que para garantizar la calidad de un producto nunca está por demás todas las precauciones que se puedan tomar, siempre y cuando nos conduzcan a afir--

mar con mayor seguridad que el producto que se consume es de alta calidad.

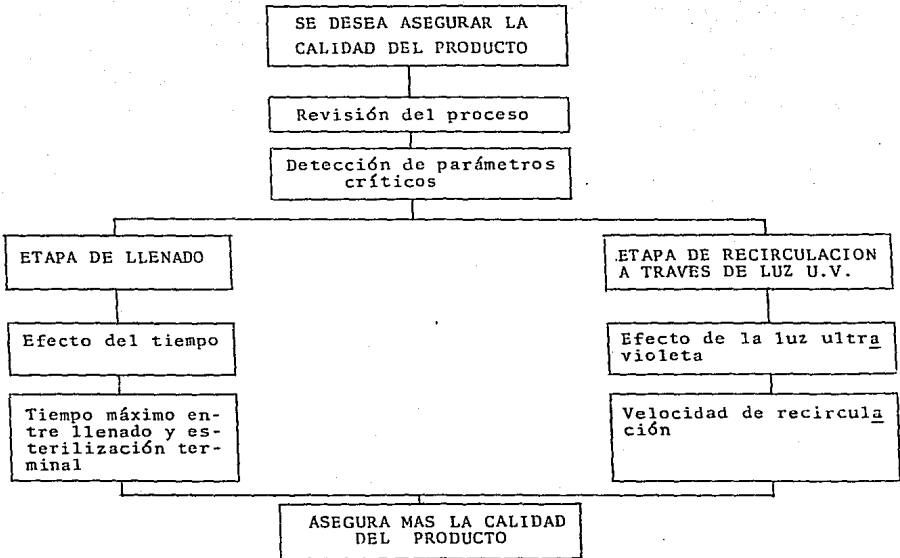


Diagrama 1. Parámetros estudiados en el proceso de fabricación de la solución electrolítica estéril.

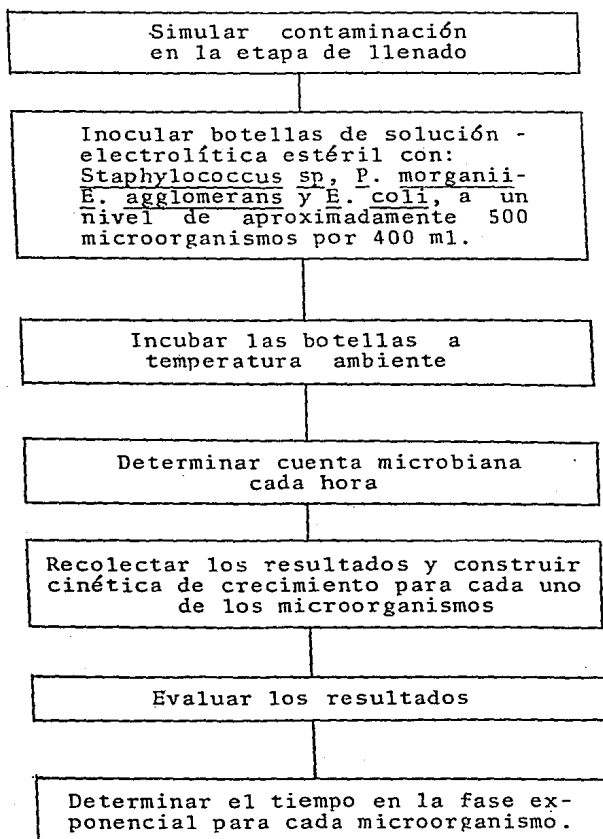


Diagrama 2. Determinación del tiempo máximo que puede transcurrir entre el llenado y la esterilización terminal.

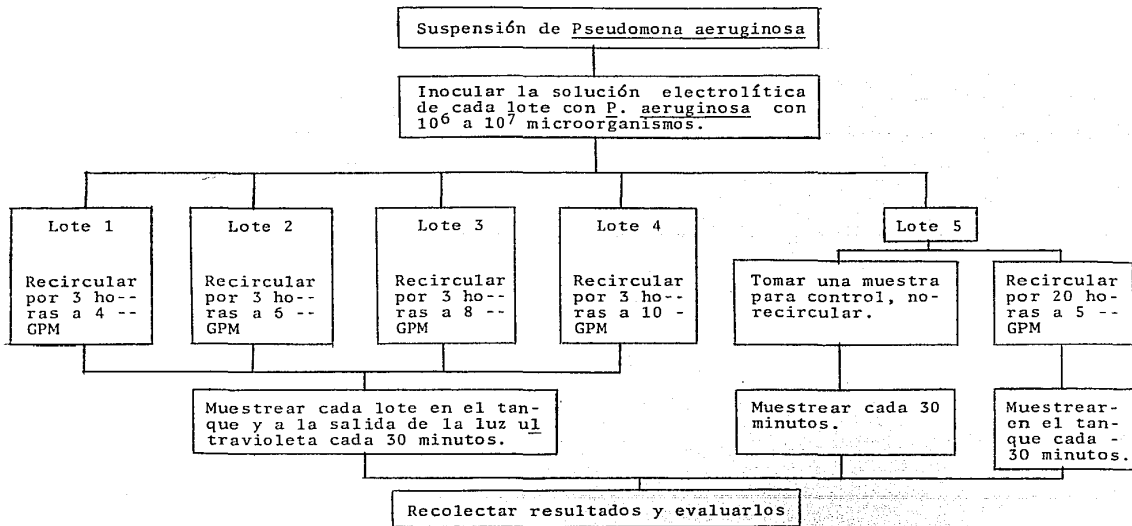


Diagrama 3. Determinación de la velocidad de recirculación de la solución a través de la luz ultravioleta.

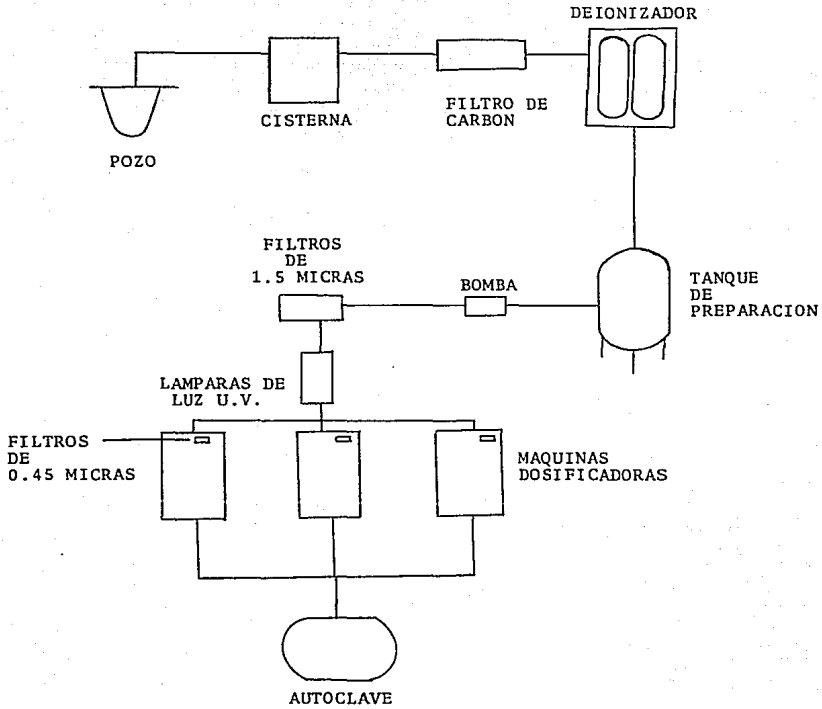


Diagrama 4. Proceso de fabricación de la solución electrolítica estéril.

IV. OBJETIVOS

Determinar los factores que afectan la carga microbiana preestéril en el proceso de fabricación de una solución electrolítica oral estéril, y establecer los parámetros de proceso en cuanto a los factores estudiados.

V. HIPOTESIS

Si analizamos el proceso de manufactura y determinamos las etapas del proceso que son críticas, teniendo un mayor impacto microbiológico sobre el producto, se podrá determinar de qué manera se puede asegurar más la calidad del producto estableciéndose límites de control de proceso.

VI. MATERIALES Y EQUIPO

1. Materiales

Manifold de filtración

Cajas de Petri

Matraz Erlenmeyer de 500 ml

Unidad de filtración Millipore

Gradillas

Pipetas graduadas de 1 ml

Tubos de ensaye de 38 x 200 mm

Pinzas de disección

Membranas Millipore de 0.45 micras de poro y 47 mm.
de diámetro

Mechero Fisher

Mechero Bunsen

Pipetero

Jeringa de 10 ml

Piseta

Asa bacteriológica

Porta asa

Probeta de 100 ml

Tripié

Guantes estériles

Guantes de asbesto

Tela de alambre con centro de asbesto

2. Equipo

Autoclave marca: Susco
 modelo: s/N

Incubadora marca: Thelco
 modelo: 1601

Refrigerador marca: American
 modelo: s/N

Fuente de vacío marca: FELI WELCH
 modelo: 1410

Tanque de preparación de soluciones de 500 litros

Caframo marca: Wiartron
 modelo: F 5

Vortes marca: Thermolyne
 modelo: M-16715

3. Soluciones

Solución de cloruro de sodio al 0.88%

Solución electrolítica estéril

Alcohol isopropílico al 70%

Hipoclorito de sodio al 0.08%.

4. Medios

Agar Soya Trypticaseína Difco

Caldo Peptonado Difco

5. Cepas microbianas

Pseudomona aeruginosa

Staphylococcus spp

Enterobacter agglomerans

Escherichia coli

Proteus morgani

VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL

- VII.1 Cuenta microbiana
- VII.2 Diluciones microbianas
- VII.3 Preparación de inóculos de Staphylococcus sp., Escherichia coli, Enterobacter agglomerans y Morganela morganii.
- VII.4 Preparación del inóculo de Pseudomona aeruginosa
- VII.5 Inoculación de solución electrolítica estéril en botellas.
- VII.6 Inoculación de solución electrolítica en el tanque con Pseudomona aeruginosa.

El desarrollo experimental se esquematiza en los diagramas 1, 2 y 3.

Todas las operaciones de trabajo se realizan en condiciones asépticas en campanas de flujo laminar, sanitizada con alcohol isopropílico al 70% (filtrado por membrana de 0.45 micras) empleando cofia, cubreboca y guantes estériles durante toda la operación.

VII.1 Cuenta microbiana

Homogeneizar la muestra, filtrar 100 mililitros en una unidad de filtración Millipore con membrana de 0.45 micras y lavar la membrana con 100 mililitros de caldo peptonado, transferirla a una caja de Petri que contenga Agar Soya Trypticaseína estéril, e incubar a 30-35°C durante 72 horas.

Realizar lecturas a las 24 y 48 horas, por separado realizar diluciones como se describe en el método correspondiente.

VII12. Diluciones microbianas

Homogeneizar la muestra y en condiciones asépticas tomar 1 mililitro de la suspensión del microorganismo y agregarlo a un tubo de ensaye que contenga 99 mililitros de caldo peptonado estéril, homogeneizar y de este tubo, tomar 1 mililitro de la suspensión con una pipeta estéril y agregarlo a un tubo de ensaye-

que contenga 99 mililitros de caldo peptonado, homogeneizar, tomar de este tubo 1 mililitro de suspensión del microorganismo y agregarlo a un tubo que contenga 99 mililitros de caldo peptonado estéril y homogeneizar. Identificar los tubos como dilución 1:100, 1:10,000 y 1:1,000,000 respectivamente.

Filtrar cada una de estas suspensiones de microorganismos en unidades de filtración Millipore con membrana de 0.45 micras, estériles y enjuagar con 100 mililitros de caldo peptonado estéril, con ayuda de unas pinzas estériles transferir cada una de las membranas a cajas de Petri estériles que contengan Agar Soya Tripticaseína.

Identificar cada caja con el nombre de la prueba, dilución y fecha. Posteriormente incubar a 35°C durante 72 horas, haciendo una lectura a las 24 y 48 horas.

Los resultados se reportan en UFC⁺/100 ml multiplicando -- por el factor de dilución.

VII.3. Preparación de inóculos de Staphylococcus sp., Escherichia coli, Enterobacter agglomerans y Morganela morgani.

El procedimiento para preparar el inóculo de éstos microorganismos es similar entre sí.

Del cultivo en agar inclinado, con ayuda de un asa bacteriológica y en condiciones asépticas, tomar una muestra y sembrarla mediante estría cerrada en una caja Petri conteniendo --
+ UFC Unidades Formadoras de Colonias

Agar Soya Tripticaseína estéril e incubar a 35°C durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas, con un asa bacteriológica y en condiciones asépticas transferir dos asadas del microorganismo desarrollado en el medio a un matraz conteniendo 200 mililitros de solución salina estéril (0.8%), homogeneizar y determinar la concentración de microorganismos, utilizando el método de cuenta microbiana. Conservar el inóculo en el refrigerador.

VII.4. Preparación del inóculo de Pseudomona aeruginosa

De la suspensión de Pseudomona aeruginosa realizar una cuenta microbiana.

VII.5. Inoculación de la solución electrolítica en botellas con Staphylococcus sp, Escherichia coli, Morganela morgani y Enterobacter agglomerans.

Pasar las botellas con solución electrolítica estéril (13 - botellas por cada microorganismo a inocular) y sumergirlas en solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 0.08% durante 20 minutos, después de este período sacarlas, sacudirlas y colocarlas en la campana de flujo laminar, posteriormente con ayuda de una jeringa estéril y en condiciones asépticas inocular cada botella con el volumen necesario de la suspensión de microorganismos.

El volumen es calculado mediante la siguiente relación:

$$\text{Volumen a inocular} = \frac{500 \text{ UFC} \times 100 \text{ ml}}{\text{Conc. de inóculo}}$$

teniendo en cuenta que se quiere lograr una concentración de 500 microorganismos por 100 mililitros en cada botella.

Si es necesario, realizar diluciones para inocular un volumen no mayor a 20 mililitros de microorganismos.

VII.6. Inoculación de la solución electrolítica del tanque con Pseudomona aeruginosa

Una vez obtenida la cuenta de la suspensión, calcular el volumen a inocular mediante la relación:

$$\text{Volumen a inocular} = \frac{1 \times 10^7 \text{ UFC} \times 100 \text{ ml}}{\text{Conc. del inóculo}}$$

considerando que se quiere lograr tener aproximadamente 1×10^7 microorganismos en un volumen de 500 litros, si es necesario - realizar diluciones para lograr inocular un volumen adecuado.

El inóculo o volumen a inocular se deposita en un matraz-estéril con tapón de algodón (bajo condiciones estériles), llevarlo al tanque que se encuentra en el área estéril y vaciar - el contenido en el tanque que contiene 500 litros de solución-electrolítica y homogeneizar la solución.

El muestreo de la solución electrolítica en el tanque de - preparación, se realiza sumergiendo un vaso de precipitados estéril dentro del mismo.

Para muestrear la solución que recircula a través de una - lámpara de luz ultravioleta, se acerca un frasco estéril a la - válvula que se encuentra precisamente a la salida de la lámpara de luz ultravioleta.

VIII. RESULTADOS

Tiempo (hr)	CFU/100 ml	log CFU/100 ml
0	147	2.167
1	210	2.322
2	198	2.297
3	237	2.375
4	260	2.415
5	357	2.553
6	291	2.464
7	352	2.547
8	436	2.639
9	654	2.816
10	893	2.951
11	1300	3.114
26	3600	3.556

Tabla 4. Crecimiento de Proteus morganii en solución electrolítica estéril en botellas.

Tiempo (hr)	CFU/100 ml	log CFU/100 ml
0	143	2.155
1	132	2.121
2	127	2.104
4	163	2.212
4	154	2.188
5	209	2.320
6	377	2.576
7	1000	3.000
8	1500	3.176
9	2300	3.362
10	2800	3.447
11	--	--
26	--	--

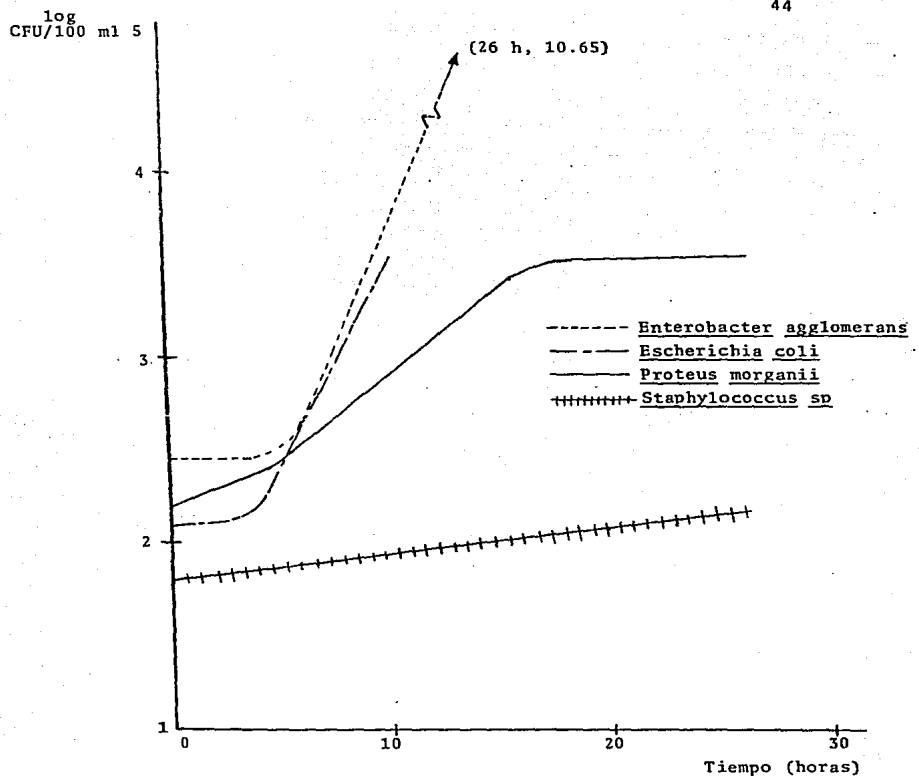
Tabla 5. Crecimiento de Escherichia coli en solución electrolítica estéril en botellas

Tiempo (hr)	CFU/100 ml	log CFU/100 ml
0	373	2.571
1	281	2.450
2	272	2.434
3	575	2.760
4	291	2.463
5	235	2.371
6	408	2.610
7	630	2.799
8	1070	3.029
9	2540	3.405
10	--	--
11	--	--
26	450 x 10 ⁸	10.65

Tabla 6. Crecimiento de Enterobacter agglomerans en solución electrolítica estéril en bo tellas.

Tiempo (hr)	CFU/100 ml	log CFU/100 ml
0	13	1.113
1	70	1.845
2	77	1.886
3	63	1.800
4	57	1.756
5	65	1.813
6	75	1.875
7	64	1.806
8	92	1.963
9	104	2.017
10	-	---
11	-	---
26	293	2.466

Tabla 7. Crecimiento de Staphylococcus sp en solución electrolítica estéril en botellas.

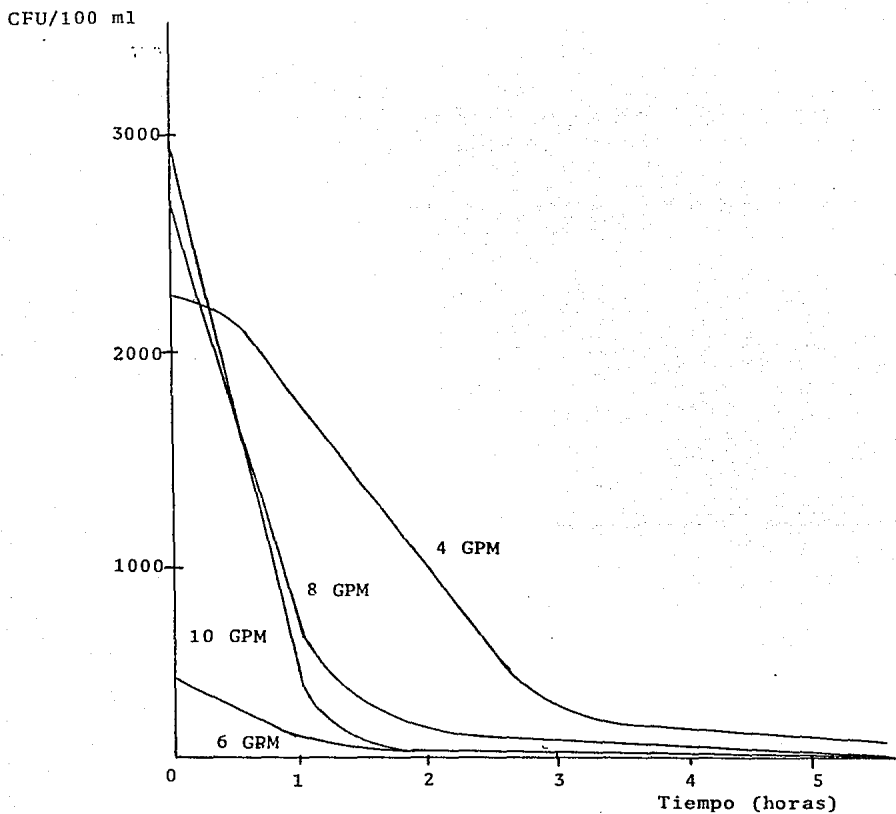


Gráfica 1. Cinética de crecimiento de los microorganismos en solución electrolítica en botellas.

VELOCIDAD	10 GPM		8 GPM		6 GPM		4 GPM	
MUESTREO	tanque	salida UV	tanque	salida UV	tanque	salida UV	tanque	salida UV
<u>INTERVALO</u>								
INICIAL*	2700	---	2600	---	380	---	2100	---
1/2 hora	750	0	1330	0	200	0	2000	0
1 hora	440	0	660	0	90	0	1750	0
1 1/2 horas	85	0	235	0	50	0	1100	0
2 horas	30	0	110	0	35	0	710	0
2 1/2 horas	15	0	66	0	19	0	490	0
3 horas	4	0	30	0	7	0	210	0
3 1/2 horas	3	0	11	0	5	0	145	0
4 horas	1	0	6	0	3	0	111	0
4 1/2 horas	0	0	3	0	1	0	78	0
5 horas	0	0	1	0	1	0	55	0

Tabla 8. Conteo de Pseudomona aeruginosa en solución electrolítica en tanque de preparación y en salida de luz ultravioleta. Los resultados se expresan en CFU/100 ml.

* Después de inocular.



Gráfica 2. Cinética de muerte de Pseudomonas aeruginosa en solución electrolítica recirculada a través del sistema de luz ultravioleta a diferentes velocidades. Para cada velocidad se prepara un lote el cual se inocula con Pseudomonas aeruginosa.

Velocidad de flujo = 5 GPM
(CFU/100 ml)

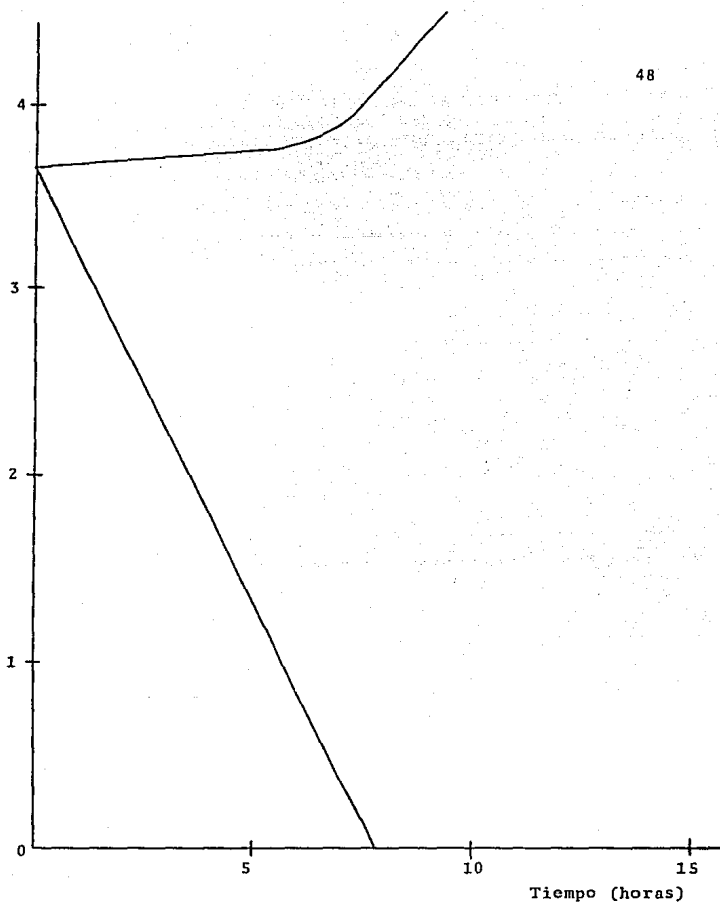
Intervalo	Tanque	log	Control	log
inicial ⁺	4100	3.6127	---	----
1/2 hora	2100	3.3222	7900	3.8976
1 hora	1600	3.2041	5500	3.7403
1 1/2 horas	910	2.9590	9400	3.9731
2 horas	550	2.7403	9000	3.9542
2 1/2 horas	430	2.6334	5100	3.7075
3 horas	260	2.4149	2900	3.4624
3 1/2 horas	96	1.9822	4600	3.6627
4 horas	53	1.7242	3400	3.5314
6 horas	7	0.8450	2900	3.4624
8 horas	3	0.4771	1.4x10 ⁴	4.1461
10 horas	0	---	2.0x10 ⁴	4.3010
12 horas	0	---	3.8x10 ⁴	4.5798
14 horas	0	---	6.9x10 ⁴	4.8388

Tabla 9. Conteo de Pseudomona aeruginosa en solución electrolítica contenida en el tanque, con recirculación a través de luz ultravioleta, y conteo del mismo en el control no tratado con luz ultravioleta.

+ Después de inocular

log
CFU/100 ml

48



Gráfica 3. Cinética de muerte de *Pseudomonas aeruginosa* al recircularse a través del sistema de luz U.V. a 5 GPM.

Microorganismo	Conc. inicial (CFU/100 ml)	μ (CFU/100 ml x H)	T _{d++} (horas)	Inicio de fase exponencial (horas)
E. agglomerans	331	1.41	0.71	7
E. coli	132	1.13	0.88	4.5
P. morganii	163	0.52	1.92	7
Staphylococcus sp	35	---	---	10

Tabla 10. Parámetros de la cinética de crecimiento de los microorganismos inoculados en la solución electrolítica contenida en botellas.

+ Velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial

$$\mu = \frac{\log (X_2 - X_1)}{t_2 - t_1}$$

++ Tiempo de duplicación

$$T_d = \frac{0.693}{\mu}$$

IX. EVALUACION DE RESULTADOS

La revisión del proceso de fabricación de la solución - - electrolítica estéril y el análisis de las etapas del mismo -- mostraron que las etapas más críticas son, la recirculación de la solución a través de la luz ultravioleta y el período que - transcurre entre el llenado de la solución en su envase hasta su esterilización terminal (Diagramas 1, 2, 3 y 4).

Esto se determinó en base a la probabilidad que se tiene para contribuir con carga microbiana o tener baja efectividad para eliminar microorganismos en el sistema de luz ultravioleta.

Considerando que la solución contiene Dextrosa se deduce de una manera lógica que puede ser un medio susceptible de crecimiento microbiano.

De acuerdo a esta consideración y suponiendo malas prácticas de manufactura en el proceso de fabricación se seleccionaron los microorganismos que se utilizaron para realizar los experimentos.

Las consideraciones efectuadas para determinar el período máximo entre el llenado de la solución y la esterilización terminal fue determinar el período durante el cual los microorga-

nismos de prueba no presentaron un crecimiento apreciable conservando su fase lag hasta la aparición de la fase exponen- - cial. Determinándose sus demás parámetros de la cinética de crecimiento como son velocidad específica de crecimiento y -- tiempo de duplicación, esto con el objeto de considerar cual- de estos microorganismos puede ser más crítico desde el punto de vista contaminación e invasibilidad en el producto.

Por otro lado, el criterio que se siguió para seleccio-- nar la velocidad de recirculación de la solución a través de- la luz ultravioleta fue seleccionar la velocidad mínima que - reduce a cero la cuenta microbiana.

X. CONCLUSIONES

El análisis de las etapas del proceso de fabricación mostró que los factores que pueden afectar microbiológicamente al proceso de fabricación son:

1. Etapa de llenado
2. Recirculación de luz ultravioleta

De los microorganismos probados en la solución contenida en botellas, se observa que el que posee una velocidad de crecimiento mayor es Enterobacter agglomerans siguiendo en orden de mayor a menor Escherichia coli, Proteus morganii y finalmente Staphylococcus sp. De estos resultados se puede inferir que el tiempo máximo a transcurrir que se recomienda es de no más de 6 horas.

Por otro lado, en la etapa de recirculación se recomienda que sea de 5 galones por minuto para reducir la carga microbiana de 10^8 microorganismos en el tanque a cero, sin embargo, cabe hacer notar que a la salida de la luz ultravioleta las cuentas microbianas siempre fueron de cero.

XI. PROPUESTAS

1. A diferentes intensidades de luz ultravioleta determinar -
la velocidad de recirculación óptima utilizando:

Staphylococcus sp

Escherichia coli

Enterobacter agglomerans

Proteus morganii

Pseudomona aeruginosa

2. Determinar la cinética de crecimiento en la solución - -
electrolítica de Pseudomona aeruginosa

Con el objeto de complementar el estudio.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Alperin, G., Parenteral Facility Design Considerations, - Pharm. Engin., 4, 37-41, 1984.
2. Geller, J. H., GMP₂ in Sterile-Product Manufacturing, -- PEMC Indus., 1, 59-61, 1982.
3. Parkinson, G., New Models to Control old Pollution Sources, Chemical Engin., 87, 38-39, 1980.
4. Baranger, G., Utilization d'une Régression Multiple dans les Dosages des Antibiotiques par la Méthode de Diffusion en Milieu Gélosé, Sci. Techniques Pharm., 9, 139 - - 146, 1980.
5. Nelson, A.A., Interpretation of Research Data: Selected - Statistical Procedures, Am. J. Hospital Pharm., 37, - - 1673-1680, 1980.
6. Weber, E., Air Pollution Control Strategy in the Federal-Republic of Germany, J. of the Air Pollution Control Association, 31, 24-30, 1981.
7. Schroeder, H.G., Theoretical Aspects of Sterile Filtra- - tion and Integrity Testing, Pharmaceutical Technology, 4, 80-85, 1980.
8. Abott, J.H., Control of Fine Particulate Emissions, Chem-Eng. Prog., 87, 47-51, 1976.
9. Balakrishnan, N. S., Emerging Technologies for Air Pollu- - tion Control, Pollution Eng., 13, 28-32, 1979.
10. Theodore, L., Industrial Air Pollution Control Equipment- for Particulates, CRC Press, Inc., West Palm Beach, Fla.
11. Wallhauber, K.H., New Investigations in to Germ Removal - Filtration, 23, 10-15, 1980.
12. Dell, L.A., Aspects of Microbiological Monitoring for - - Nonsterile and Sterile Manufacturing Environments, Pharm. Tech., 8, 12-16, 1979.

13. Greisman, S.E., Comparative Pyrogenic Reaction of Rabbit and Man to Bacterial Endotoxin, Proc. Soc. Exptl. Biol. - Med., 131, 1154-1158, 1969.
14. Honeywell, G.E., Microbial Studies on the Water Systems in a Pharmaceutical Industry, Dev. Ind. Microbiol., 3, -- 306-312, 1962.
15. Levin, J., Clottable Protein in Limulus, Thrombos. Diathes. Haemorrh., 19, 186-197, 1968.
16. Rahn, O., Injury and Death of Bacteria by Chemical Agents, Biodynamica, Monograph No. 3, 1945.
17. Underwood, E., Ecology of Microorganisms as it Affects -- the Pharmaceutical Industry, Pharmaceutical Microbiology-2, 253-265, 1977.
18. Federal Standard 209B, Clean Room and Work Station Requirements, Controlled Environment, Amendment-1, Mayo 30, 1 -- 35, 1976.
19. NASA, Standards for Clean Rooms and Work Stations for the Microbially Controlled Environment, NASA, NHB 5340-2, 1-- 35, 1967.
20. Abbott Laboratories de México, Controles Positivos para las Membranas de las Unidades de Filtración, Proceso Básico de Operación GC-PT-105, 1-4, 1985.
21. Abbott Laboratories de México, Preparación, Prueba, Almacenamiento y Manejo de Medios de Cultivo, Proceso Básico de Operación GC-PT-049, 1-12, 1985.
22. Abbott Laboratories de México, Programa de Control Microbiológico Ambiental, Proceso Básico de Operación GC-PT -- 060, 1-20, 1985.
23. Abbott Laboratories de México, Preparación y Evaluación de Efectividad de Soluciones Germicidas, Proceso Básico de Operación GC-PT-124, 1-5, 1985.
24. Wilson, J.D., Biological Control of Parenterals, Abbott Laboratories de México, 1-35, 1984.
25. Hardwidge, E.A., Validation of Filtration Processes Used for the Sterilization of liquids, Research Committee of -- the Parenteral Drug Association, 30, 65-74, 1984.
26. Buonicore, A.J., Control de la Contaminación del Aire, -- Chem. Eng., 87, 95-101, 1980.