

30627
1/24



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
Incorporada a la U.N.A.M.

**Validación del Proceso de Esterilización con
Membrana usado para la Esterilización de
Líquidos en la Industria Farmacéutica**

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
JORGE ERIC DE JESUS ANAYA IZQUIERDO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

	PAGINAS
Abreviaturas	
Introducción	1
I.- Generalidades	4
II.- Prueba de Punto de Burbuja	18
III.- Prueba de Difusión	24
IV.- Reto Microbiológico de la Membrana	29
V.- Material y Métodos	38
VI.- Resultados y Discusión	44
VII.- Conclusiones	56
Anexos	57
Referencias Bibliográficas y Hemerográficas	69

ABREVIATURAS

AST	Agar de Soya Tripticaseína
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
HIMA	Health Industry Manufacturers Association
Kg/cm^2	Kilogramos fuerza por cm^2 (Unidad de Presión)
LRV	Valor de Reducción Logarítmica
USP	United States Pharmacopela

INTRODUCCION

Una de las características indispensables de una solución parenteral es la esterilidad, ésto es, la ausencia absoluta de cualquier microorganismo viviente. Para obtener una solución libre de microorganismos vivos es necesario someterla a un proceso de esterilización; entre los procesos de esterilización más empleados se encuentra el que utiliza calor humedo dentro de autoclaves. Desafortunadamente, no todos los principios activos de las soluciones inyectables son estables al calor.

Cuando se encuentra ante una solución con uno o varios principios activos termolábiles, la opción más segura para su esterilización es la filtración por membrana, la cual constituye un método de esterilización en "frío" que no altera químicamente a la solución, presentando la ventaja adicional de la eliminación de materia particulada extraña que sea de un tamaño mayor a la del diámetro de poro empleado. Por lo antes expuesto, la filtración por membrana puede considerarse como el método ideal de esterilización de soluciones inestables al calor.

Por otra parte, se debe recordar que la filtración no está sujeta a los parámetros exactos de tiempo-temperatura como sucede en los procesos de esterilización por calor, por

lo que es difícil de una manera práctica, asegurar que realmente el proceso de filtración está esterilizando, y por lo tanto, el nivel de confianza en la esterilidad es más controvertido. La validación es un proceso que permite resolver esta controversia de una manera adecuada. Validar un proceso quiere decir "darle fuerza, firmeza o confianza" y en este contexto se considera que un proceso está validado cuando los resultados de estudios apropiados demuestran que el proceso produce el efecto deseado al realizarlo y lo hace de una manera reproducible y suficientemente homogénea (6), para este caso, que la filtración proporciona el grado deseado de confianza en la esterilidad.

Otro factor importante a considerar, el cual demuestra una vez más la necesidad que existe de validar el proceso de filtración, es el hecho de que actualmente el método empleado para verificar la esterilidad de un lote de productos parenterales, es la "Prueba de Esterilidad", la cual no constituye una evaluación de la efectividad del proceso de esterilización en sí misma, sino más bien una "indicación" de que el proceso se ha realizado satisfactoriamente (54), esto se debe a que la prueba se realiza en muestras tomadas aleatoriamente, con el consecuente error que esto implica. Finalmente, no se debe olvidar que para garantizar la completa este-

rilidad de un lote, sería necesario realizar la prueba de ---
esterilidad en cada una de las piezas del lote, lo cual es --
imposible desde todos los puntos de vista. Reconociéndose por
tanto, la confianza que proporciona la validación al proceso
de filtración.

El objetivo del presente trabajo es presentar un --
programa para validar el proceso de filtración por membrana.

Cabe hacer notar que los conceptos y métodos aquí ~
presentados no intentan ser considerados como estándares para
validar un proceso de filtración estéril, que el programa ---
aquí presentado sólo es reproducible bajo las condiciones que
se mencionan, y se reconoce además, que existen otros métodos
técnicamente equivalentes para alcanzar este propósito.

GENERALIDADES

Una solución parenteral se define como aquella solución que se encuentra estéril, libre de materia particulada y libre de pirógenos (54).

El término estéril es absoluto y se define como la ausencia total de microorganismos vivos, y nunca debe ser -- usado o considerado de una manera relativa como parcialmente estéril o casi estéril.

La materia particulada se refiere a las sustancias móviles, no disueltas, presentes involuntariamente en un producto parenteral.

Los pirógenos se definen como productos metabólicos de microorganismos vivos, o los mismos microorganismos muertos, que causan una respuesta pirética específica por inyección. Estos se presentan cuando se permite el crecimiento de los microorganismos. Químicamente se les considera como lipopolisacaridos, solubles en agua pero insolubles en solventes orgánicos (54).

De lo anterior se deduce que existen tres clases - generales de contaminantes a considerar en una solución --- parenteral: las impurezas disueltas (entre las que se encuentran los pirógenos), los microorganismos (formadores de pirógenos) y la materia particulada.

Las fuentes principales de contaminación deben ser reconocidas y consideradas cuando se fabrican soluciones ---- inyectables, para evitarlas. Las Buenas Prácticas de Manufac-tura son una herramienta indispensable en este caso.

Métodos Generales de Eliminación de Contaminantes

Los métodos empleados para eliminar un tipo parti-- cular de contaminantes no sólo dependerá de la naturaleza de los contaminantes, sino también del nivel de pureza deseado. Si el producto debe ser estéril, aún la presencia de un micro-organismo viable representa un fracaso, debido a que puede -- reinfestar el líquido rápidamente (14).

Las impurezas orgánicas disueltas en agua es posi-- ble eliminarlas con mayor efectividad mediante ósmosis inver- sa o filtración a través de carbón activado, mientras que los agentes inorgánicos disueltos pueden eliminarse por ósmosis - inversa, destilación o intercambio iónico (14).

Los microorganismos deben tratarse de diferentes -- maneras. Sin embargo los métodos más seguros para obtener --- fluidos estériles son el calor (seco o húmedo), la esteriliza- ción química y la filtración a través de membranas (14).

La filtración es frecuentemente el método de elección para la esterilización de soluciones que son química o físicamente inestables en procesos de esterilización terminal. En muchas aplicaciones la filtración se aproxima a la técnica de esterilización ideal. Esta puede proporcionar un alto grado de confianza en la esterilidad sin la degradación química que de otra manera alteraría el filtrado (1).

La filtración esterilizante se utiliza comúnmente en la industria farmacéutica para procesos en los cuales las soluciones de producto final o los vehículos para suspensiones se esterilizan por filtración previo a un proceso de llenado aséptico. Otros pasos de manufactura aséptica, tales como la adición de un material insoluble para formar una suspensión, pueden llevarse a cabo entre la filtración y el llenado. Otro proceso que comúnmente utiliza la filtración esterilizante es la filtración de soluciones químicas a granel previo a un proceso de cristalización aséptico para eliminar la posibilidad de que los organismos queden ocluidos dentro de los cristales (1).

La filtración también elimina a las células microbianas como fuente de sustancias pirógenas (14).

Una vez que la solución del producto ha sido preparada, ésta debe filtrarse. El objetivo primario de la filtración es clarificar la solución. A un alto grado de clarificación se le denomina "pulir" la solución. Este término se ---

aplica cuando la materia particulada que se remueve es de --
aproximadamente 2 micras de tamaño. El paso siguiente, la ---
eliminación de la materia particulada de hasta 0.2 micras de
tamaño, eliminará los microorganismos y completará la este-
rilización "fría". Una solución que tiene un alto grado de -
nitidez imparte la impresión de alta calidad y pureza, ca-
racterísticas deseables para una solución parenteral (15).

MEDIOS DE FILTRACION

En microfiltración crítica - se entiende por micro-
filtración crítica la técnica en la cual se utilizan filtros
de membrana microporosa, los cuales pueden eliminar bacterias
y otras partículas microscópicas en suspensión de un líquido
que pasa a través de éstos - , el éxito depende a menudo de -
sutiles diferencias en las características de los filtros.
El farmacéutico debe por lo tanto, conocer algo respecto de
estas diferencias y de las formas en que pueden afectar sus
resultados (14).

Todos los medios para filtrar pertenecen a una de
dos clases, los de "profundidad" y los de "tamiz". Las dos --
brindan ventajas importantes y las dos tienen determinadas -
limitaciones. Afortunadamente para el usuario ambos tipos --

tienden a complementarse. Cuando se efectúan microfiltraciones críticas, la elección óptima suele ser casi siempre una combinación de ambos (14).

Los filtros de profundidad han adquirido ese nombre debido al hecho de que la filtración se produce principalmente dentro de las profundidades de la matriz del filtro. Estos filtros están constituidos por fibras y partículas orientadas al azar, las que se han prensado, enrollado, o unido de otra forma entre sí, formando una masa tortuosa de canales de flujo. El entrapamiento ocurre cuando una partícula menor a las dimensiones del canal, se comienza a depositar en una dirección o a formar una capa dentro del canal. La estructura porosa de un filtro de profundidad no es regular ni definida, razón por la cual no es posible determinar su eficiencia de retención en términos absolutos. Los filtros de profundidad reciben, en cambio, una capacidad nominal, que se determina experimentalmente luego de su fabricación (14, 15).

En la industria farmacéutica los filtros de profundidad que se utilizan en combinación con las membranas se les conoce con el nombre de "prefiltros".

Entre las ventajas que acreditan los filtros de profundidad debe incluirse su gran capacidad para retener impurezas en suspensión y por lo tanto su capacidad para procesar fluidos muy contaminados por partículas. Por el lado negativo todo medio de filtración en profundidad puede absor-

ber y retener un volumen relativamente elevado del producto, lo que constituye un serio problema cuando se trata de una solución valiosa (14).

Los filtros de tamiz han sido denominados de esta manera debido a que retienen a las partículas sobre su superficie "tamizándolas", es decir, separándolas físicamente del líquido, de manera similar al colador común de cocina. La --retención, más que un fenómeno de profundidad, es un fenómeno de superficie. La estructura es de manera normal rígida, --uniforme y continua. El tamaño de los poros se predetermina para cada procesamiento.

La característica más valiosa de un filtro de tamiz esta constituida por su facultad de retener absolutamente todas las partículas sobre su superficie, tanto las biológicas-- como las no biológicas, mayores que un tamaño predeterminado. Algunos ejemplos de medios de filtración de este tipo son los tamices de vidrio, reticulado de dacrón, y de particular interés para la microfiltración crítica, los filtros de mem---brana.

El tamaño y la uniformidad de la abertura de los --poros en un filtro de tamiz pueden ser predeterminados con --precisión y también pueden ser controlados con precisión.

Entre las ventajas de los filtros de tamiz se in--ciuyen las siguientes:

- Es un filtro absoluto cuya eficiencia no la afectan las va-

riaciones en la velocidad de flujo o diferencias de presión.

- La estructura es homogénea y continua; por lo tanto, no se produce migración del medio a la solución.
- Debido a su área de superficie interna baja, los filtros tamiz absorben muy poco de una solución.

Debido a que la retención se encuentra limitada -- casi por entero a la superficie y no a la profundidad de la matriz del filtro, un filtro de tamiz posee una capacidad de retención de partículas en suspensión relativamente reducida. Tanto los materiales gelatinosos, como un fluido muy contaminado con partículas, lo bloqueará con rapidez (14).

FILTROS DE MEMBRANA

Los filtros de membrana actúan en particular como filtros tamiz microporosos que retienen sobre su superficie absolutamente todas las partículas y microorganismos mayores que el tamaño de poro establecido (14).

Aunque los filtros de membrana han sido producidos por más de 100 años, éstos no fueron usados ampliamente en los Estados Unidos de Norteamérica sino hasta después de la Segunda Guerra Mundial. De acuerdo con un reporte de -----

Goetz, cit por, BOWMAN, F.W., CALHOUN, M.P. y WHITE, M. Microbiological Methods for Quality Control of Membrane Filters, p.222., los alemanes hicieron un uso dramático de éstos durante la guerra para prevenir epidemias que pudieran ser causadas por la contaminación de los suministros de agua. Utilizando los filtros de membrana, desarrollaron un ensayo rápido para -- determinar la seguridad en los suministros públicos de agua después de los bombardeos. BOWMAN, op.cit, p.222.

La tecnología para la producción de los filtros - de membrana fue posteriormente llevada a los Estados Unidos de Norteamérica donde, bajo el patrocinio del U.S. Department of the Army, se realizaron investigaciones extensivas sobre su producción. Esta investigación resultó en los procedimientos prácticos para su producción comercial. Los filtros --- fueron producidos de un éster de celulosa en hojas con un - espesor aproximado de 150 micras. Los tamaños de poro fueron predeterminados y controlados en el proceso de manufactura Loc.cit.

En la década de los años cincuenta los científicos encontraron innumerables aplicaciones para los filtros de - membrana como una herramienta analítica; han sido ampliamente usados en el muestreo y medición de la materia particulada del aire, análisis microbiológicos de agua y alimentos, diagnóstico clínico, filtración estéril, fabricación de cerveza y pruebas de esterilidad (45).

Hoy en día los filtros de membrana se usan casi exclusivamente para la filtración de soluciones parenterales. Su efectividad en la retención de partículas, tasa de flujo, no reactividad (inercia química), control de su integridad -- antes y después de la filtración y características de destrucción justifican su uso y la exclusión de muchos otros tipos. Los filtros de membrana se fabrican en diversos materiales -- polímeros diferentes que proveen un amplio rango de propiedades y compatibilidades químicas; entre los materiales más --- usados se encuentran: acetato y nitrato de celulosa, polite--trafluoroetileno, poliamida, cloruro de polivinilo, nylon, -- etcetera (14,15).

Los filtros de ésteres de celulosa (acetato o ni---trato) son los más comúnmente utilizados, proveen un material filtrante versátil y uniforme para todas las microfiltraciones críticas excepto en las que se requiere temperaturas superior--res a 75°C, o cuando se trata de filtrar cetonas, esterés, --- nitroparafinas, o ácidos y álcalis fuertes (14,56).

Los filtros de membrana se encuentran en el mercado como discos y cartuchos. La elección de la configuración de - filtro apropiada depende de la aplicación específica que se - dará al mismo. Al seleccionar entre un filtro en forma de dis- co o de cartucho, es de fundamental importancia la velocidad de flujo por unidad de tiempo deseada para la solución en -- cuestión. Los filtros ,en forma de cartucho proveen velocida- des de filtrado mayores que los que tienen forma de disco (14,15),

TAMAÑO DE POROS DE LOS FILTROS DE MEMBRANA DISPONIBLES

Los filtros de membrana pueden obtenerse en un amplio intervalo de tamaño de poros que van generalmente de 14 micras a 0.025 micras. Para esterilizaciones "frías" se recomienda un filtro de membrana cuyo tamaño de poro es de 0.22 micras, aunque un tamaño de poros de 0.45 micras retendrá a la mayoría de las especies de microorganismos (14).

PREFILTRACION

Para alcanzar un rendimiento óptimo, un filtro de membrana se encuentra generalmente precedido por un filtro de profundidad de tamaño semejante. El empleo de un filtro de profundidad previo al filtro de membrana absoluto puede multiplicar varias veces la eficiencia del filtro de membrana. Los fluidos severamente contaminados con materia particulada pueden obturar con rapidez los poros de los filtros de membrana, en especial cuando las partículas tienen prácticamente las mismas dimensiones que el tamaño de los poros, estas partículas actúan como tapas. Un prefiltro elegido en forma adecuada es el que posee la mayor eficiencia en el ran-

go de tamaño de las partículas que tienen mayor probabilidad de obturar el filtro de membrana Ibid, p.888.

FILTRACION EN SERIE

Consiste en filtrar un líquido a través de una serie de filtros, cuyo tamaño de poros va disminuyendo progresivamente. Si se trata de discos, la serie suele instalarse en un solo portafiltros. El primer filtro puede ser un filtro de profundidad y los restantes, filtros de membrana, -- cada uno de los cuales posee un tamaño de poros más pequeño que el que le precede.

La filtración en serie es frecuentemente la más económica, y en algunos casos, la única manera de filtrar un líquido que contiene una pesada carga de material coloidal. Cada filtro de membrana elimina la mayor parte de los sólidos que con mayor probabilidad obturarán el filtro que lo sigue, obteniéndose una mayor capacidad de caudal a través de todo el sistema. Ibid.p.892.

FILTRACION CON MEMBRANA EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

Hoy en día la industria farmacéutica utiliza la filtración por membrana para la esterilización de soluciones --- parenterales, oftálmicas, nasales, y en general toda forma de dosificación estéril líquida, que no pueda ser esterilizada - por medio del calor húmedo.

Actualmente el equipo para utilizar los filtros de membrana se encuentra estandarizado. Para el caso de membranas en forma de disco - usadas en la esterilización de parenterales de pequeño volumen - , que son objeto de este estudio, encontramos que en la industria farmacéutica los diámetros - estandar para uso industrial son: 142 y 293 milímetros de -- diámetro en el caso de discos; y 10 pulgadas de altura para - el caso de cartuchos. Dichas membranas son instaladas dentro de una carcasa llamada portafiltros o portacartuchos, según - se trate de discos o cartuchos.

Las carcasas están construidas de un acero inoxidable el cual se puede sanitizar fácilmente, se trata de acero inoxidable tipo 316.

FILÓSOFIA DE LA VALIDACION

Validación y validar; un proceso, una máquina, un método, se ha convertido hoy en una expresión común de nuestro lenguaje técnico y en este caso como una palabra perfectamente adaptada a su contenido ideológico, pues validar --- significa "dar fuerza o firmeza a una cosa", afirmación que en términos generales coincide con lo que pretendemos precisar con su uso en el vocabulario científico (6,55).

El proceso de validación se define como el reto -- intencionado a un proceso (durante su desarrollo), para determinar cuales variables deben ser controladas para asegurar la producción consistente de un producto o sus intermediarios (34). Como consecuencia lógica de la definición anterior se formula la pregunta ¿Por qué Validar? Y la respuesta se fundamenta en tres puntos:

- 1) Es un requerimiento estipulado en las Prácticas Correctas de Manufactura que establecen los requerimientos mínimos que un proceso debe satisfacer.
- 2) Provoca una sensación de un buen negocio, introduciendo el producto con un buen soporte de su historia técnica (Funciona como una motivación)
- 3) El resultado final de la validación nos dará -- una elevada calidad y un producto más uniforme y reproducible.

Las etapas básicas necesarias para validar un proceso son:

- 1) Documentación escrita
- 2) Parámetros de manufactura
- 3) Pruebas a estos parámetros
- 4) Controles en proceso
- 5) Pruebas al producto final

..... (52).

Puede considerarse validado un proceso de filtración esterilizante cuando los resultados de estudios apropiados - demuestran que el proceso hace lo que se pretende que haga. Esto significa que el proceso de filtración imparte el grado requerido de confianza en la esterilidad o la reducción microbiana al filtrado, sin modificar las propiedades físicas y --- químicas de éste dentro de los límites establecidos (1).

CAPITULO 11

PRUEBA DE PUNTO DE BURBUJA

2.1 Definición

El punto de burbuja es la presión requerida para - expulsar el líquido de los poros de una membrana saturada (53).

Los filtros de membrana poseen pasajes discretos y uniformes que atraviesan su espesor y que pueden considerarse como capilares finos y uniformes (14).

Cuando un capilar se pone en contacto con la superficie de un líquido humectante, la superficie del líquido --- dentro del capilar se eleva por la acción de fuerzas de superficie. La diferencia resultante en el nivel del líquido dentro y fuera del capilar es proporcional a la tensión superficial - del líquido y al coseno del ángulo de contacto entre el líquido y la pared del capilar. Esto es también, inversamente proporcional al diámetro del capilar (2).

Cuando se conecta un suministro de gas presurizado - al final del capilar y se incrementa la presión, se forza al - líquido a salir del capilar. El punto en el cual ocurre esto, trae como resultado un burbujeo dentro del líquido. A la presión requerida para formar las burbujas se le refiere como el "Punto de Burbuja" del capilar (2).

Mientras más pequeño sea el diámetro del capilar más grande será la diferencia en el nivel de la superficie del líquido y consecuentemente será mayor la presión requerida para formar la burbuja de gas (Ley de Laplace; ecuación 1).

De acuerdo a

$$\text{B.P.} = \frac{K \cdot 4 \cdot \gamma \cdot \cos \theta}{d} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde:

B.P. = Presión de Punto de Burbuja (Bubble Point)

K = Factor de corrección por forma

γ = Tensión superficial del líquido humectante

θ = Angulo de contacto líquido-sólido (el coseno del cual es 1.0 si la humectación es completa entre el líquido y la pared del capilar).

d = Diámetro del Capilar

Una membrana de microfiltración está compuesta por una serie distribuida de poros que retienen al líquido humectante. Por lo tanto, su punto de burbuja es una medida del tamaño de poro más grande (2,11,14,38,48).

El punto de burbuja de una membrana de disco de pequeña área puede determinarse de una manera rápida y exacta. Este valor determinado para cualquier membrana humectada es menor del que se esperaría de la ecuación 1. La razón de esto es que para las membranas reales el ángulo de contacto es --

usualmente mayor que cero y la Ley de Laplace se puede aplicar sólomente a los poros cilíndricos ideales. Un poro en forma de rajadura, por ejemplo, muestra sólomente la mitad de presión de punto de burbuja de un poro perfectamente redondo del mismo diámetro. Otra explicación para las variaciones en el punto de burbuja entre membranas de la misma porosidad pero de diferentes tipos, se debe a la diferencia en el ángulo de contacto con el agua como agente humectante y la marcada diferencia en la distribución de los tamaños de poros aún cuando se trate de membranas de la misma porosidad (2).

La ecuación 1 es exclusiva para capilares cilíndricos que no se encuentran normalmente en los filtros comunes; debido a ésto, generalmente se introduce un factor de corrección por forma. Para propósitos teóricos se asigna arbitrariamente el valor de 1.0 al factor de corrección por forma y potencialmente los poros irregulares pueden ser tratados como sus equivalentes cilíndricos con la ecuación 1 (11).

Independientemente del valor real del factor de corrección, el modelo del poro cilíndrico predice que el tamaño de poro más grande en un filtro es inversamente proporcional a la presión a la cual el volumen del gas de prueba no se hace evidente (11).

2.2 Interpretación de la Prueba de Punto de Burbuja

Todos los fabricantes de membranas especifican cual es la presión de Punto de Burbuja para cada uno de sus productos. Si al momento de realizar la prueba se encuentra que la presión de Punto de Burbuja es menor a la especificada por el fabricante, se tiene una indicación de que los poros de la membrana son mayores al diámetro especificado, o que la membrana tiene alguna grieta o rajadura. Por lo tanto, esta membrana no puede utilizarse para la esterilización de una solución parenteral y debe desecharse (3,48).

2.3 Importancia

Existen varios aspectos que hacen del Punto de Burbuja una prueba de gran utilidad. En primer lugar se encuentra, la posibilidad de usar un método no destructivo para determinar la integridad de la membrana, el cual debe ser realizado antes y después de la filtración, como lo especifican las prácticas correctas de manufactura actuales; en los Estados Unidos de Norteamérica se exige la realización de esta prueba en las Regulaciones Federales de ese país (1, 25,46).

En segundo lugar la prueba se puede realizar con el equipo con que se cuenta en todos los laboratorios que fabrican soluciones parenterales como es: una fuente de aire presurizado (o cualquier otro gas de prueba), un tanque presurizable con su respectivo manómetro, y un matraz con agua.

Es decir, no se necesita de ningún equipo sofisticado. Es importante hacer notar, que actualmente en el mercado se encuentran a la venta sofisticados aparatos para la determinación del Punto de Burbuja, los cuales trabajan con métodos electromecánicos. El uso de estos equipos implica una fuerte inversión, además la validación de estos aparatos es más compleja por tratarse de equipos con dispositivos digitales.

En tercer lugar se debe mencionar, que la prueba puede ser realizada por cualquier persona que reciba una capacitación adecuada, esto es, que la puede efectuar un operario calificado con experiencia o un técnico.

Finalmente, esta prueba tiene la ventaja de poder usarse tanto en membranas de disco como en cartuchos.

2.4 Limitaciones de la Prueba de Punto de Burbuja

- 1) Es virtualmente imposible detectar una disminución en el Punto de Burbuja causada por "un" poro de tamaño mayor al especificado por el fabricante en un filtro de membrana (1).
- 2) El Punto de Burbuja puede ser influenciado por el área del filtro, aunque este efecto puede ser enmascarado por el procedimiento de prueba. La explicación es la siguiente: Existen dos Puntos de Burbuja, el intrínseco y el observado.

El Punto de Burbuja Intrínseco es aquel valor --

que esta determinado por la estructura microporosa del filtro (tamaño y distribución de los poros) y es independiente del área del filtro.

El Punto de Burbuja Observado es aquel que detecta la persona que realiza la prueba cuando aparecen las burbujas en el seno del líquido de prueba.

A esto se debe que el Punto de Burbuja observado durante la realización de la prueba pueda llegar a diferir del intrínseco.

Lo anterior constituye una imprecisión en la medición del Punto de Burbuja (21).

PRUEBA DE DIFUSION

3.1 Definición

Debido a la insensibilidad, inexactitud, y subjetividad implicadas en la determinación visual del Punto de Burbuja en membranas de gran área, fue desarrollada una prueba - más precisa y objetiva, la Prueba de Difusión (2).

La razón fundamental de este método de prueba es, - que el flujo de gas a una presión de reto del 80 - 90 % del - Punto mínimo de Burbuja a través de una membrana integra es - causado únicamente por difusión. Si el flujo de gas medido en el lado inferior de la membrana es mayor al causado por la difusión, el flujo adicional debe ser atribuido al flujo viscoso de gas a través de grietas o rajaduras o a poros de mayor tamaño al especificado, de los cuales ha sido desalojado el - líquido humectante. Reti se ha referido al flujo viscoso de - gas como "el flujo de un volumen de gas" (2,22).

La difusión es causada por la diferencia parcial de presión a través de la membrana húmeda. Como la solubilidad - del gas aumenta con la presión, se tiene como resultado una - mayor concentración de gas disuelto en la capa de líquido que se encuentra del lado donde hay mayor presión. El sistema tiende a igualar la concentración en la capa de agua (máxima - entropía), lo cual resulta en un estado constante de transpor-

te de gas del lado superior al lado inferior, donde debido a la menor presión parcial, el gas de prueba, abandona continuamente el líquido (2).

El grado de transporte de gas depende de la presión diferencial a través de la membrana y de la solubilidad y movilidad (coeficiente de difusión) del gas de prueba dentro de la capa de líquido. La difusión es directamente proporcional a la porosidad de la membrana (fracción de volumen vacío del volumen total de la membrana) y a su área, mientras que es inversamente proporcional al grosor de la capa de agua. Para membranas simétricas puede decirse que el grosor de la capa de agua es aproximadamente igual al grosor de la membrana (2).

La tasa de difusión para el nitrógeno a través de un filtro de membrana esta dada por:

$$J = \frac{(66.5) \cdot D \cdot S \cdot P_p \cdot A \cdot \rho}{t \cdot P_{atm} \cdot T}$$

donde

- J : difusión en ml/min (determinada bajo las condiciones de 20°C y 1013 mbar de presión)
- D : Coeficiente de Difusión en cm²/min (para el N₂ a 20°C en agua es de 9.84 X 10⁻⁴)
- S : Coeficiente de Solubilidad en nmol · bar⁻¹ · ml_{H₂O}⁻¹ (para el N₂ a 20°C en agua es de : 698.73)

P_p : Presión de Prueba en bar

A : Area de la Membrana en cm^2

ρ : Porosidad de la Membrana

t : Grosor de la Capa de agua en micras

P_{atm} : Presión Atmosférica en bar

T : Temperatura Absoluta en $^{\circ}K$ del gas que se difunde en el dispositivo para medir el volumen

66.5 : Unidad de Conversión Constante

Debe hacerse notar que en contraste con la prueba de Punto de Burbuja, la prueba de Difusión es solamente una medida indirecta del tamaño de poro más grande. El Punto de Burbuja de la membrana bajo consideración es mayor que la presión de prueba seleccionada cuando el flujo de gas está dentro de los límites de flujo de difusión (2).

El principio de la Prueba de Difusión es, en realidad, el de la Prueba de Punto de Burbuja, altamente refinado y capaz de producir resultados objetivos y cuantitativos (23).

3.2 Importancia

- 1) Este método de prueba, satisface los dos requisitos dictados por las Correctas Prácticas de Manufactura Actuales, en lo tocante a pruebas de integridad en -

- filtros de membrana; estos son: a) es una prueba no destructiva y b) la prueba produce resultados no --- ambiguos (25).
- 2) El flujo difusional, en la región exactamente por debajo del Punto de Burbuja (80-90% P.B.), provee una - indicación valida de la integridad de un filtro esterilizante (22).
 - 3) La prueba de difusión es capaz de detectar fallas -- (trátese de grietas o poros) de un tamaño de 5 a 10 - micras en filtros de membrana de gran superficie (2).
 - 4) La prueba tiene una ventaja práctica, en su realización no hay ningún juicio subjetivo. La tasa de flujo de gas se mide a una presión indicada; y estos números (presión y tasa de flujo) son objetivos (25).
 - 5) En la práctica, la difusión a través de un filtro de membrana se determina con un dispositivo similar al - usado en la determinación del Punto de Burbuja (2).

3.3 Límites de Aplicación

Un elemento filtrante que muestra menor difusión, - no necesariamente tendrá mejores características de retención. Esto sólo significa, que el filtro tiene menos área de - filtración efectiva, o que la membrana tiene una porosidad -- reducida, o que es más gruesa (2).

Otra limitante se debe a la cantidad y variabilidad del flujo de gas a través de un filtro de membrana de gran superficie; las grietas pueden estar ocultas, lo cual repercute sobre la calidad del filtrado. Puede mejorarse la detección de tales fallas ocultas, por medio de la prueba de Punto de Burbuja, con la cual se pueden detectar poros de tamaño excesivo en filtros de membrana de gran superficie, con la condición - de que se determine el Punto de Burbuja con suma sensibilidad (2).

3.4 Desventajas

1) En algunos casos la medida del flujo de difusión puede ser impráctica, como en el caso de varios filtros en un proceso en línea. Esto sucede cuando en un equipo están montados varios cartuchos. Los cuales deben ser verificados individualmente y después se vuelven a colocar dentro del sistema, lo que puede llevar a tener dudas sobre la integridad del sistema completo (3,53).

2) Esta prueba requiere de una gran precisión, por lo -- que se debe determinar con la mayor sensibilidad posible. Ya que por ejemplo, en un cartucho que presenta una grieta de un tamaño nominal de 15 micras, se hace necesario para su detección, que el instrumento usado para la determinación del flujo de gas, permita la detección de un flujo de 0.2 ml/min, -- además de la difusión esperada de 6.4 ml/min para el cartucho bajo consideración (2).

CAPITULO IV

RETO MICROBIOLOGICO DE LA MEMBRANA

La eliminación de microorganismos por filtración es uno de los procedimientos más importantes en la producción -- aséptica de productos farmacéuticos, en orden a satisfacer -- los requerimientos de la prueba de esterilidad (35).

Los filtros de membrana se usan mundialmente para - producir productos parenterales libres de bacterias, hongos y levaduras. Típicamente, éste método se usa en la esteriliza-- ción de drogas inyectables lábiles al calor. Este también se usa previo a una esterilización terminal con calor de una dro-- ga inyectable para controlar el contenido microbiológico, o - la biocarga de estos productos. El presente estado del arte - en filtración por membrana, dicta que para ambas aplicaciones la validez de este proceso de filtración sea inicialmente es-- tablecida, y que por lo tanto, el proceso sea rutinariamente monitoreado. Esta validación puede obtenerse por ambos proce-- sos, ya sea en el laboratorio, o en la rutina del proceso de manufactura (13,23).

El reto microbiológico de la Membrana es una prueba biológica. Los ensayos biológicos son de naturaleza destruc-- tiva: su uso excluye la subsecuente filtración de productos. Sin embargo, a pesar de esta desventaja, estos ensayos ofrecen el único método verdadero para determinar la retención bacte--

na por filtros de membrana, debido a que la bacteria es realmente usada como entidad de prueba. Los ensayos de retención bacteriana son también muy sensibles. El uso de gran número de partículas que son capaces de autoreplicarse, permiten que -- aún reducidos números de células que emerjan a través de un filtro, fácilmente puedan manifestarse por ellas mismas ---- (1,13,45).

El nivel de sensibilidad de la prueba, sin embargo, depende grandemente del organismo elegido, el método de cultivo, y el sistema usado para recuperar al microorganismo del filtrado. La calidad del funcionamiento de una membrana de -- grado esterilizante depende de factores similares: tipo, cantidad y estado fisiológico de los organismos presentes, así -- como también de la dinámica del fluido del sistema de filtración (1,13,27,31,35).

Debido a que el método usado para el cultivo del -- microorganismo de prueba influye en el tamaño de las células, forma y arreglo, debe elegirse el procedimiento de cultivo -- que proporcione la entidad de prueba más adecuada para la --- prueba de retención. El medio de cultivo y la fase de creci-- miento del organismo son otros factores que afectan el tamaño de la célula y que no pueden ser ignorados (13).

Es incumbencia de ambos, fabricante de filtros y -- usuario, la ejecución de la validación en cada aplicación --- crítica de la filtración con membrana. El fabricante del fil-

tro tiene la responsabilidad de diseñar el producto con el proceso de validación en mente, y el usuario debe evaluar los diferentes métodos disponibles para realizar la validación -- del funcionamiento de este producto (13).

La validación de los métodos de esterilización térmico y químico ha sido relativamente directa comparada con la esterilización por filtración. La validación de los filtros de retención bacteriana posee un nivel de complejidad adicional, ya que su acción no es solamente una función del sistema de filtración usado pero si hay una dependencia crítica en la elección del microorganismo de reto y las condiciones de operación durante la filtración (31).

Comunmente, la habilidad para esterilizar de un --- filtro puede ser determinada en una de dos formas - ya sea -- por pruebas físicas o pruebas biológicas - . Mientras que cada una de éstas tiene ciertas desventajas, frecuentemente se usan en conjunto para la completa caracterización de un filtro de membrana (13, 31).

Los principales parámetros que afectan la realización de la prueba de reto microbiológico son los siguientes:

- 1) Organismo de Prueba
 - a) Mantenimiento del Cultivo
- 2) Tamaño del organismo y Estado de Agregación
- 3) Concentración/Nivel total de reto (organismos/cm³)

- 4) Concentración efectiva
 - a) Viabilidad después del reto
 - b) Tamaño de la muestra del filtrado
- 5) Reto hidráulico al sistema de filtración
(presión transmembrana)
- 6) Tiempo de duración de la Prueba

(31)

4.1 Algunas Consideraciones acerca del Mecanismo de Retención Bacteriana en un Filtro de Membrana

La retención bacteriana en un filtro de membrana no puede ser explicada por completo, si se intentan aplicar por separado los mecanismos de: maya o criba, adsorción, impactación y captura electrostática. Ya que existen algunas inconsistencias como la siguiente. Los filtros retienen bacterias y al mismo tiempo permiten el paso de partículas inorgánicas de aproximadamente el mismo tamaño (57).

Las investigaciones sobre el particular, han concluido en la elaboración de una "Teoría Unificadora" ; la cual explica que los filtros de membrana funcionan de varias formas --- para remover los contaminantes. Los mecanismos de maya, adsorción, impactación y atracción electrostática funcionan independientemente o en combinación. El mecanismo de captura esta influenciado por factores tales como: tipo de polímero del -- filtro, tamaño de poro, área, presión diferencial, y la naturaleza del fluido que esta siendo procesado (27, 57, 58).

Zierdt (49), encontró que las membranas de celulosa comunmente usadas, adsorben más bacterias, células y otras -- partículas que los filtros de policarbonato.

4.2 Nivel de Reto

En toda Prueba de Retención Bacteriana, es necesari--o definir el Nivel de Reto. El Nivel de Reto se define como la concentración de un microorganismo dado por centímetro --- cuadrado de superficie de filtración; con él cual se prueba - la habilidad que tiene la membrana para retener dicho micro-- organismo (27).

El Nivel de Reto Total para un filtro de membrana, se puede expresar como:

$$\begin{aligned} \text{Reto Total} &= \frac{\text{Numero de microorganismos filtrados}}{\text{Area del Filtro}} \\ &= \frac{C \ V_{\text{Total}}}{A} \end{aligned}$$

donde: C - representa la densidad bacteriana por mililitro de solución

C V - reto bacteriano total

A - área de filtración

(27).

Actualmente la concentración de microorganismos --- (nivel de reto) y el género de estos a utilizarse en una ----

prueba de retención, no han sido establecidos con exactitud.

Los fabricantes de filtros sin embargo, comunmente retan las membranas de 0.45 micras con Serratia marcescens y las de 0.22 micras con Pseudomonas diminuta (26).

-----La revisión número XXI de la Farmacopéa de -- los Estados Unidos de Norteamérica (U.S.P.) establece que los filtros esterilizantes retendrán retos apropiados de ----- Pseudomonas diminuta (9).

Desde 1979 está en discusión el nivel de reto para probar la eficiencia de los filtros esterilizantes (50). En 1982 HIMA (Health Industry Manufacturers Association), describe una prueba de reto microbiano para filtros de membrana, en éste procedimiento la membrana es retada con 10^7 organismos de P. diminuta por cm^2 de superficie filtrante (8). Aunque la tendencia actual de los fabricantes de membranas es utilizar un reto total de 10^{10} organismos, se pueden citar, por dar un ejemplo, los casos de: Brunswick Validation Test Report y -- Millipore Validation Guide.

4.3 Valor L R V

El Valor de Reducción Logarítmica (LRV), es una medida de la habilidad de un filtro para retener un organismo -- indicador específico. Los rangos de LRV se definen cuando se estandarizan los retos microbiológicos. Matemáticamente se -- define como el logaritmo de base diez de la razón del número de microorganismos en el reto al número de microorganismos en

el filtrado.

No es común que los usuarios de los filtros determinen el valor LRV. En lugar de calcularlo, éstos se remiten a los datos de los fabricantes, los cuales establecen LRV mínimos bajo condiciones estandarizadas; se vuelve a citar en este caso: Brunswick Validation Test Report y Millipore Validation Guide.

A continuación se dan algunos ejemplos para ilustrar el cálculo de los valores LRV cuando el filtrado es estéril y cuando se observa paso de microorganismos. En ambos casos, el filtro cuenta con un área de filtración efectiva de 500 cm² y cada filtro fue retado con 5 X 10⁹ microorganismos.

1.- FILTRADO ESTERIL

$$LRV = \log_{10} \frac{\text{número de organismos en el reto}}{\text{número de organismos en el filtrado}}$$

$$= \log_{10} \frac{5 \times 10^9}{1^*}$$

$$= \log_{10} 5 \times 10^9$$

$$LRV \geq 9.7$$

* Cuando el filtrado es estéril, se sustituye 1 en el denominador, y el resultado se reporta como mayor o igual al LRV calculado.

2.- FILTRADO NO ESTERIL

Paso de 100 microorganismos

$$\text{LRV} = \log_{10} \frac{5 \times 10^9}{10^2}$$

$$= \log_{10} 5 \times 10^7$$

$$\text{LRV} = 7.69$$

(1)

Los resultados se reportan como mayor o igual al \log_{10} del número total de organismos en el reto cuando el filtrado es estéril y como "fallo" cuando el filtrado es no estéril.

Debe hacerse notar que estos procedimientos severos de reto representan extremos de las condiciones que normalmente se pueden esperar, ya que dichas condiciones fueron establecidas después de realizar retos en los cuales se observó el paso de organismos con filtros de 0.22 micras (1, 43). A pesar de ésto, muchos de los fabricantes actuales observan que no hay paso microbiano en esta prueba. Por lo tanto, se puede frecuentemente obtener solamente una estimación del límite más bajo del LRV (1).

El concepto de Valor de reducción logarítmica ha sido propuesto por el grupo de trabajo de la HIMA (Health Industry Manufacturers Association) que estudia la validación de los filtros para la Esterilización de Líquidos (1).

En la literatura sobre el particular, encontramos algunos sinónimos del concepto L₉₅. Algunos autores utilizan expresiones como: Razón de Reducción, Índice de Seguridad --- Microbiológica, Razón Beta, y Título de Reducción (50).

MATERIAL Y METODOS

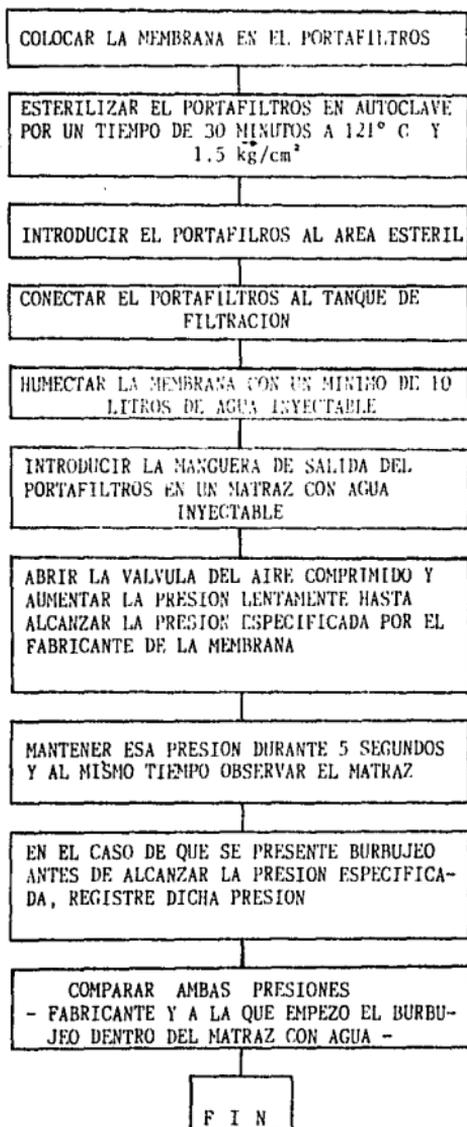
- 1) Para realizar las Pruebas de Punto de Burbuja y de Difusión se utilizaron los siguientes materiales:
 - a) Membrana Millipore de 293 mm de diámetro y 0.45 micras de porosidad, fabricada de una mezcla de acetato y nitrato de celulosa. Catálogo Millipore: HA WP 293 25.
 - b) Previo a la Membrana se colocó un prefiltro de fibra de vidrio, también Millipore (microfibras de vidrio de borosilicato con resina acrílica), de 257 mm de diámetro. Catálogo Millipore: AP 15 257 25.
 - c) El prefiltro y la membrana se montaron en un Portafiltros Millipore de Acero Inoxidable Sanitario 316 y un diámetro de 293 mm, con una manguera de salida para el fluido de silicón.

La Metodología para la Prueba de Punto de Burbuja y para la Prueba de Difusión se explican en los siguientes diagramas de bloques.

PRUEBA DE PUNTO DE BURBUJA

DIAGRAMA DE BLOQUES

- 39 -

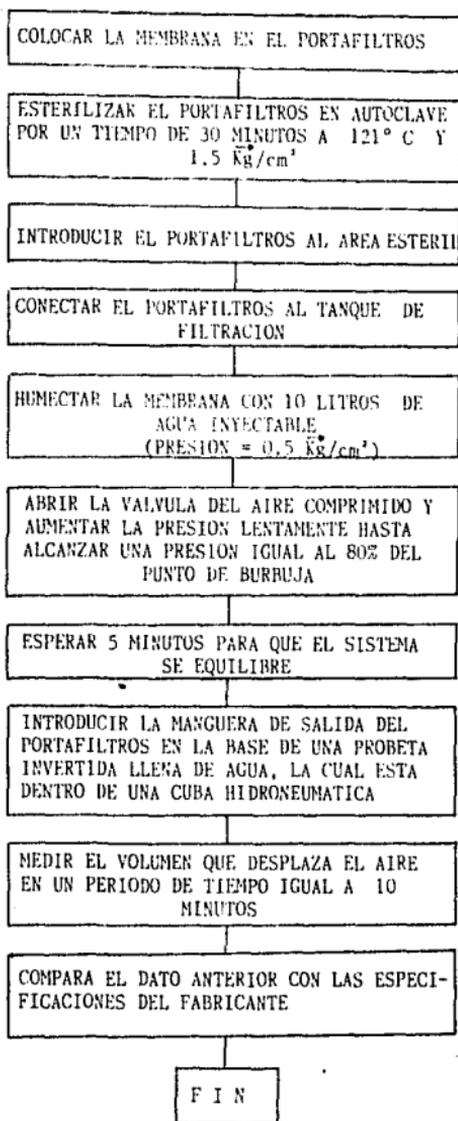


.....(2,3,16,23,32,37,48).

PRUEBA DE DIFUSION

DIAGRAMA DE BLOQUES

- 40 -



.....(2,3,16,23).

II) Para realizar la Prueba de Retención Microbiana se ----
utilizaron los siguientes materiales:

a) Cepa Bacteriana

Serratia marcescens ATCC 14756

Esta cepa fué comprada al Cepario del Departamento de ---
Biotecnología y Bioingeniería del CENTRO DE INVESTIGACION
Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

b) Indicadores Biológicos: Para controlar la efectividad en
los procesos de esterilización por Vapor. En este caso se
utilizaron tiras "DUO-SPORE" Marca Propper. Las tiras ---
"DUO-SPORE" estan formadas de esporas en estado latente -
de poblaciones estandarizadas de Bacillus stearrowthermophilus
Y Bacillus subtilis, obtenidos de cultivos ATCC.

c) Indicadores Químicos: Para verificar el tiempo y la tempe-
ratura de esterilización. En este caso se utilizaron el -
"Temp-Tube" para verificar la temperatura y el "Time-Card"
para verificar el tiempo de esterilización, ambos indica-
dores son marca Propper.

d) Aparato para realizar la Prueba de Esterilidad marca ----
Millipore con membrana de 47 mm y porosidad de 0.22 micras,
Catalogo Millipore: GS WP 047 00.

e) Caldo de Soya Tripticaseína, Marca Bioxon.

f) Caldo de Tioglicolato, Marca Difco.

g) Agar

h) Agua Peptonada

g) Suspensión Bacteriana

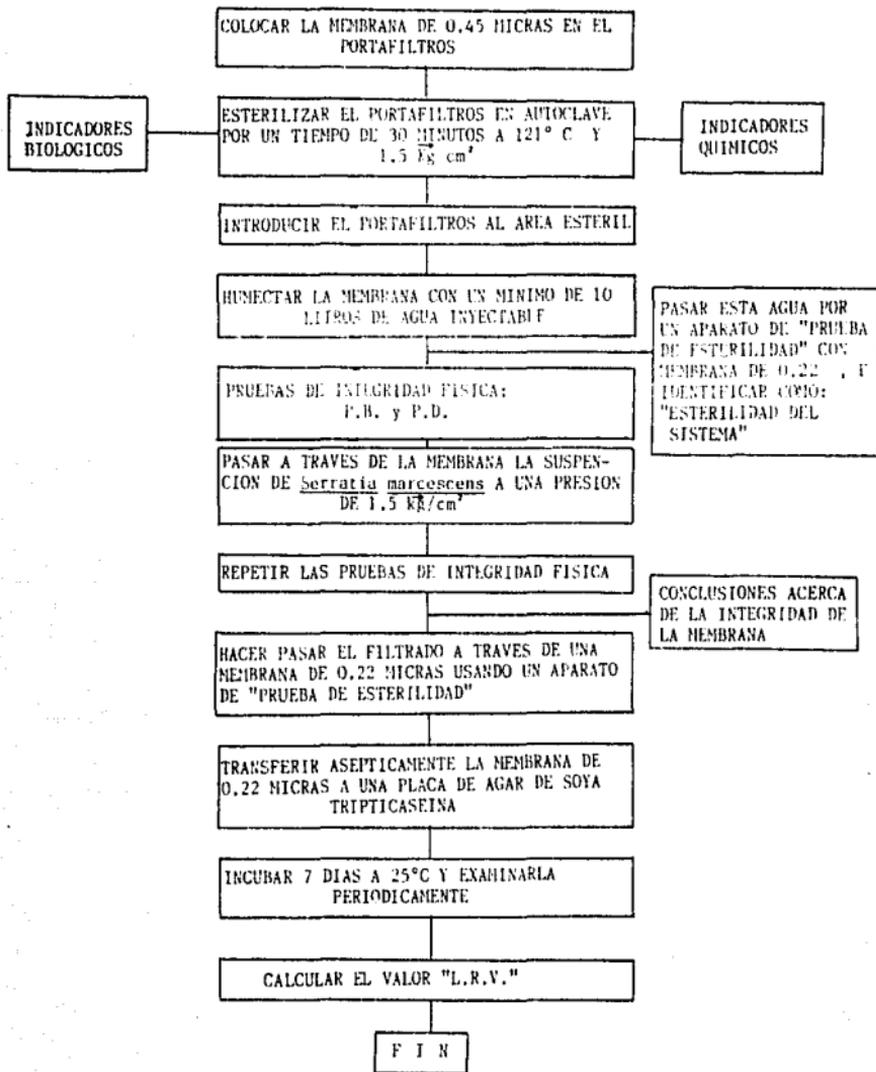
De acuerdo a la Norma D 3863 80 del ASTM, la suspensión --
bacteriana para esta prueba se prepara de la siguiente --
manera: Añada 1 ml de un caldo de cultivo de -----
Serratia marcescens, el cual tenga 18 ± 2 horas de incu--
bación a 99 ml de agua peptonada estéril al 0.1%, para --
obtener una concentración de trabajo de 10^7 organismos --
por mililitro. Incube la suspensión a una temperatura de
25° C.

La Metodología con la que se realizó la Prueba de
Retención Microbiana, se explica en el siguiente diagrama de
bloques.

PRUEBA DE RETENCION

DIAGRAMA DE BLOQUES

- 43 -



.....(13,16,31,35).

RESULTADOS Y DISCUSION

I.- Pruebas de Integridad Física

PUNTO DE BURBUJA

Presión soportada por la membrana
sin presentarse la presencia de
burbujas. = 2.5 $\overline{\text{kg/cm}^2}$

Punto de Burbuja Especificado por
el Fabricante. = 2.3 $\overline{\text{kg/cm}^2}$

No. Lote del Fabricante: 2030P01 - 46

El resultado anterior indica que la membrana sometida a esta prueba, no presenta grietas ni rajaduras, y también indica que el tamaño de poro es el especificado por el fabricante.

PRUEBA DE DIFUSION

Flujo de Aire Difundido
a través de la Membrana. = 1.0 cc/min.

No. Lote del Fabricante: 2030P01 - 46

En este caso el Fabricante no proporciona la Especificación.

El Flujo es tan pequeño, que se comprobó el hecho de que no es recomendable usar esta prueba para membranas en forma de disco.

Sin embargo, la prueba realizada no se demerita; ya que si la membrana presentara grietas o rajaduras, la difusión del aire, aumentaría considerablemente y aunque no se cuenta con la especificación del Fabricante, la prueba así realizada evidenciaría inmediatamente la presencia de cualquier falla en la integridad de la membrana.

II.- Prueba de Retención Bacteriana

No. Lote del Fabricante de la Membrana: 2030P01 - 46

A) ESTERILIZACION DE LA MEMBRANA EN AUTOCLAVE

1. Los Indicadores Químicos dieron los siguientes resultados:

"Temp-Tube" - El contenido del pellet indicador se fundió perdiendo su forma original y cambió a color rojo.

Esto indica que se alcanzó la temperatura de esterilización de 121°C.

"Timecard" - El color de las cuatro hojas del trebol cambió completamente, indicando que el tiempo de esterilización fue el adecuado.

Las características de estos Indicadores Químicos se -- pueden consultar en los Anexos de este Trabajo.

2. Los Indicadores Biológicos dieron los siguientes resultados:

"DUO - SPORE" - Siguiendo las instrucciones para su cultivo, no se observó crecimiento en ninguna de las cuatro tiras de esporas -- empleadas después de una incubación de

siete días a una temperatura de 55°C. Se utilizaron dos tiras testigo, las cuales no fueron esterilizadas, con el fin de comprobarla bio-habilidad de las esporas empleadas.

En ambas tiras se presentó crecimiento después de 24 hrs. de incubación a 55°C.

El resultado arrojado por el "DUO - SPORE" indica que la penetración de calor dentro de la cámara de la autoclave fue la adecuada.

Las Características del "DUO - SPORE" se pueden consultar en los Anexos de este Trabajo.

3. En Resumen: Los resultados arrojados tanto por los Indicadores Químicos como por los Indicadores Biológicos, demuestran que el proceso de esterilización por autoclave al que se sometió el portafiltros que contenía la membrana fue efectivo; dando de esta manera confiabilidad al proceso.

B) ENSAYO SOBRE LA ESTERILIDAD DEL SISTEMA DE FILTRACION

Se muestrearon asépticamente 100 ml , de los 10 litros de agua grado inyectable utilizados para humectar la membrana. La muestra se sometió a la Prueba de Esterilidad, ---- utilizando una membrana de 0.22 micras.

Después de siete días de incubación de la muestra a 37° C, no se detectó la presencia de contaminación, tanto de aerobios como de anaerobios.

Dados los resultados anteriores, se concluye que el Sistema de Filtración utilizado para la prueba se encontraba estéril.

El Reporte de este Resultado se encuentra en los -- Anexos de este Trabajo.

C) PRUEBAS DE INTEGRIDAD ANTERIORES A LA PRUEBA DE RETO

Punto de Burbuja = 2.3 $\bar{K}g/cm^2$

Flujo de Aire Difundido
a través de la Membrana = 1.2 cc/min.

Analizando los resultados de esta pruebas tenemos:

1. Se elimina la posibilidad de que la membrana se haya dañado durante su manipulación y autoclaveado.
2. Se confirma que el Sistema de Filtración se encontraba

bien armado.

3. El Punto de Burbuja indica que se trata de una membrana de 0.45 micras.

D) ANALISIS DEL FILTRADO DE LA SUSPENSION DE "Serratia marcescens"

Los 800 ml de filtrado resultantes, se sometieron a la Prueba de Esterilidad utilizando una membrana de 0.22 micras.

Después de siete días de Incubación en AST, a 25 °C, no se detectó crecimiento alguno.

E) PRUEBAS DE INTEGRIDAD POSTERIORES A LA PRUEBA DE RETENCION

Punto de Burbuja = 2.5 Kg/cm²

Flujo de Aire Difundido
a través de la Membrana = 1.0 cc/min.

Estos resultados señalan que la membrana no sufrió daño -- alguno durante la Prueba de Retención.

F) CALCULO DEL VALOR "LRV"

No. de organismos en el Neto = 4.57×10^7

(Determinado por Cuenta
en Placa de la Suspensión Bacteriana)

No. de organismos en el Filtrado = CERO - Filtrado Estéril -

$$\text{LRV} = \log_{10} \frac{4.57 \times 10^7}{1^*}$$

* Debido a que el filtrado fue estéril, se sustituye 1 en el denominador, para efectos del cálculo.

$$\text{LRV} \geq \log_{10} 4.57 \times 10^7$$

$$\text{LRV} \geq 7.6599$$

G) PROTOCOLO DE VALIDACION

Tomando como base los resultados anteriores, se elaboró el siguiente Protocolo de Validación.

PROTOCOLO DE VALIDACION
* REPORTE DE RESULTADOS *

-51-

PROCESO DE FILTRACION POR MEMBRANA PARA
ESTERILIZAR SOLUCIONES PARENTERALES

- AREA DE PRODUCCION DE INYECTABLES -

Fecha: _____ Hora de Inicio: _____ Hora de Terminación: _____

Area donde se realizó la Prueba: _____

Condiciones Ambientales: Temperatura: _____

Humedad Relativa: _____

Presión Positiva: _____

Nombre del Operario que efectuó las Pruebas: _____

I.- SISTEMA DE FILTRACION

a) Características de las Membranas utilizadas

- Marca: _____

- No. Lote: _____

- Diámetro: _____

- Porosidad: _____

b) Características del Portafiltros utilizado

- Marca: _____

- Material de Construcción: _____

- Diámetro: _____

II.- SUSPENSION BACTERIANA

Microorganismo utilizado

- Genero: _____ Especie: _____

- Catálogo ATCC: _____

- Procedencia de la Cepa: _____

- Medio de Crecimiento de la Cepa: _____

- Temperatura de Incubación: _____

- Preparación de la Suspensión (Norma de Referencia): _____

- Concentración de la Suspensión: _____

- Nombre del Analista que preparó la Suspensión: _____

III.- ESTERILIZACION DEL SISTEMA DE FILTRACION

-52-

Fecha: _____

Equipo Utilizado: _____

Nombre del Operario: _____

No. de Ciclo de Esterilización: _____

Temperatura de Esterilización: _____

Tiempo de Esterilización: _____

Indicadores Químicos empleados: _____

Indicador Biológico empleado: _____

IV.- INTEGRIDAD DEL SISTEMA - PREVIO A LA PRUEBA DE RETENCION -

Líquido Humectante: _____

Punto de Burbuja: _____

Flujo de Aire Difundido: _____

Presencia de Fugas: _____

Sistema Integro: Si _____ No _____

V.- ESTERILIDAD DEL SISTEMA

Volumen de Líquido Humectante Muestreado: _____

Resultado Prueba de Esterilidad: _____

VI.- FILTRACION DE LA SUSPENSION BACTERIANA

Presión de Filtración: _____

Duración de la Filtración: _____

Volumen de Filtrado Resultante: _____

Resultado Prueba de Esterilidad: _____

VII.- INTEGRIDAD DEL SISTEMA - POSTERIOR A LA PRUEBA DE INTEGRIDAD -

Punto de Burbuja: _____

Flujo de Aire Difundido: _____

Presencia de Fugas: _____

Sistema Integro: Si _____ No _____

VIII.- CALCULO DEL "L.R.V"

-53-

No. de Microorganismos en el Reto: _____

No. de Microorganismos en el Filtrado: _____

$$L.R.V. = \log_{10} \frac{\text{No. Microorganismos en el Reto}}{\text{No. Microorganismos en el Filtrado}}$$

Notas: 1) Si el filtrado resulta estéril, se sustituye "1" en el denominador, y el resultado se reporta como mayor o igual (\geq) al LRV calculado.

2) Si el filtrado no es estéril se reporta "fallo"

$$L.R.V. = \log_{10} \text{_____} =$$

IX.- OBSERVACIONES

X.- RESPONSABLES

Departamento de Producción

Nombre: _____ Firma: _____

Departamento de Microbiología

Nombre: _____ Firma: _____

Vo,Bo. Gerencia de Producción: _____

Vo. Bo.Gerencia de Control de Calidad: _____

XI.- PROGRAMA DE VALIDACION

Esta Prueba se realizará una vez al año.

La Prueba se manejará independientemente de la producción, y con el área específicamente preparada para la Prueba.

Será objeto de Revalidación:

- a) Cambio de Marca de Membranas
- b) Cambios Mayores en el Personal de Producción.
- c) La Contaminación de algún producto, el cual haya sido filtrado utilizando este Sistema.

H) IMPACTO DE LA VALIDACION SOBRE LA CALIDAD DE LA PRODUCCION

Después de un año de realizada la validación y sin haberse presentado motivo alguno para realizar una revalidación. No se presentó la Contaminación de ninguno de los 50 lotes producidos de Dexametasona Inyectable 2ml.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- 1.- Se Validó el Sistema de Filtración por Membrana
- Disco de 293 mm de diámetro y 0.45 micras de porosidad - utilizado para la producción de --
Soluciones Parenterales sometidas a un Proceso de Llenado Aséptico.

- 2.- Se realizaron las siguientes Pruebas:
 - I) Integridad Física - Punto de Burbuja
- Prueba de Difusión
 - II) Reto Microbiológico con Serratia marcescens.

- 3.- Se estableció el Protocolo de Validación del Proceso.

- 4.- Se observó el Impacto de la Validación sobre la Calidad de la Producción.

A N E X O S

México, D.F., a 26 de julio de 1985

CHINDIN

PRODUCTOS FARMACEUTICOS, S.A. DE C.V.

M. C. JOVITA MARTINEZ CRUZ
Encargada del Cepario del Depto. de Biotecnología
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.

P R E S E N T E :

Por medio de la presente me permito solicitar a usted las siguientes cepas microbianas:

- 1) Serratia marcescens ATCC 14756
- 2) Bacillus subtilis
- 3) Candida sp

Los microorganismos anteriores se utilizarán en estudios de validación de procesos de fabricación estéril de medicamentos como son:

- 1) Filtración através de membranas esterilizantes (Serratia marcescens).
- 2) Como microorganismos de referencia en pruebas de Control ambiental -- (B. subtilis y Candida sp).

El uso de las cepas queda bajo mi responsabilidad.

Sin más por el momento quedo de usted.

Vo. Bo.


A p e n t a m e n t o
Q.F.B. JORGE E. AMAYA IZQUIERDO.
Supervisor de Producción.

Q.F.B. CARLOS R. BAÑOS URQUIJO.
Gerente de Producción.

c.c.p. Dr. FERNANDO ESPARZA GARCIA
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
Exp.

JEAI/jan *



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

- 59 -

AVENIDA IPN 2508
APARTADO POSTAL 14-740

ESQ. CALZADA TICOMAN
MEXICO 14, D. F.
CODIGO POSTAL 07000

RFC: CIE 601028 ILR
CED. DE EMP. 1008808

DEPARTAMENTO O SECCION: BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA

RECIBO N° 655

RECIBIMOS DE: PRODUCTOS FARMACEUTICOS, S. A. DE C. V.
DIRECCION: LAGO TANGARICA No. 18
COL. GRANADA C.P. 11520
DELEGACION MIGUEL HIDALGO México, D. F.

FECHA		
26	Julio	1985
DIA	MES	AÑO

CONCEPTO	IMPORTE
PREPARACION DE 3 CULTIVOS MICROBIANOS	\$ 9,000.00
(NUEVE MIL PESOS 00/100 M.N.)	
<i>[Circular stamp and signature]</i>	
TOTAL	\$ 9,000.00

Atentamente,

CLIENTE

Sandra Díaz

OK ←

FOR PROOF OF PENETRATION OF STEAM INTO PACKS WHITE
K ← AND WHITE ● CHANGE TO MATCH THE BLACK 'O'
U.S. Pat. No. 3,174,349 Proper Mfg. Co. Inc., L.I.C., N.Y. 11501

Contains *Protein* *Hydrolyzate*
Full price *1.99* - *2.99* - *3.99*
Date *2-25-68* *ATC*

TIMECARD



For positive
proof of
sterility
examine at
250-1120-11
proper
MFG. CO. INC.

TIMECARD



For positive
proof of
sterility
examine at
250-1120-11
proper
MFG. CO. INC.

TIMECARD



For positive
proof of
sterility
examine at
250-1120-11
proper
MFG. CO. INC.

PROPPER TEMPTUBE®

Propper TEMPTUBES have been designed for use in 250° F. (121° C.) steam sterilization cycles. When exposed to such a cycle the pellet will fuse, lose its original shape and change to a red color. The melting is the critical factor, the change of color is not.

Steam sterilization is subject (among other factors) to three critical processing conditions: temperature, time, and air elimination. Insufficient levels of either of these critical variables may compromise the sterilization process. The presence of large amounts of air in the sterilizer chamber or in the packages may result in a lowering of the temperature in the area of the air inclusion.

For most effective use please follow these suggestions:

1. Place a TEMPTUBE in the center of each package or in the place judged the most difficult for the steam to reach.
2. In larger packages it may be advisable to use several tubes at critical locations.
3. When loading the autoclave be sure to follow accepted standards of practice and the instructions of the manufacturer for that specific type of autoclave.
4. To verify that external processing conditions were met, affix a TEMPTUBE to the outside of one package with autoclave tape. (Attaching it with autoclave tape will prevent the tube from falling to

the bottom of the autoclave and removal will be possible without disturbing the sterile contents of the package.) This tube may be examined immediately when the load is retrieved from the autoclave.

5. Autoclave the load in accordance with manufacturer's instructions.
6. When the load is removed from the autoclave, examine the TEMPTUBE which was affixed to the outside of one of the packages. If this tube shows incomplete melting, the contents of that autoclave load must not be used and the cause for the failure must be determined before another cycle is attempted.
7. When a sterile package is opened for use the TEMPTUBE should be retrieved and examined. If it indicates incomplete melting, the contents of that package must not be used.
8. If an internal TEMPTUBE shows incomplete melting, the lot number or load control number of that package must be noted and the person in charge of sterilization procedures for the institution must be notified immediately. It is recommended that in such cases all packages sterilized in that cycle and in subsequent cycles of that autoclave be regarded as questionable until a determination is made about their status. Such critical evaluation may require

opening additional packages for examining the internal indicators. The sterilizer chart should also be examined as well as bacteriological testing results and other evidence considered important. If subsequent cycles show similar underprocessing, that sterilizer must not be used until it is checked by a qualified serviceman.

While sterilization monitors cannot be considered to give proof of sterility, they can serve as a valuable aid in the monitoring of the conditions present in the interiors of the packages during the sterilization process and allow observation of the results immediately upon opening of the packages.

Propper TEMPTLOES have been designed to function in accordance with the requirements of U.S. Government Specification GG-I-521.

**propper manufacturing co., inc.,
long island city, new york 11101**

Duo-Spore®

Indicadores biológicos para controlar la efectividad en los procesos de esterilización por Vapor (desplazamiento de gravedad o alto vacío), por Gas Oxido de Etileno o por Calor Seco.

□ Cumple con la Pharmacopea U.S.A., MIL-S-36588 y otros standards de gobernanación.

□ Su viabilidad ha sido probada y certificada dentro de su período de validez.

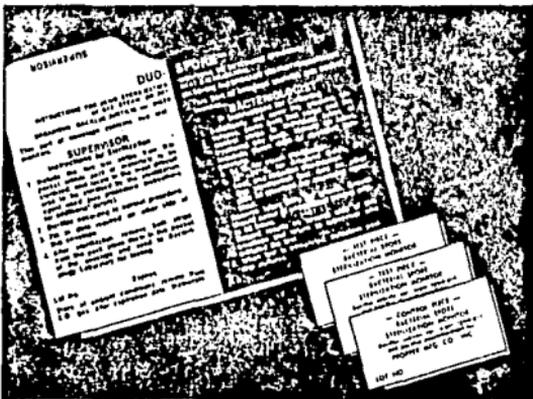
□ La información sobre la forma de empleo, que se suministra junto con cada unidad, cumple con todos los requisitos oficiales.

□ Se presentan en cajas de 25 juegos, conteniendo cada juego dos sobreseculitras de prueba y un sobre-tira de control.

□ El mismo "test" puede aplicarse para cualquier tipo de esterilización hospitalaria.

□ El sistema oficial de la técnica de esterilización recomendado por las autoridades competentes, incluye el uso de indicadores biológicos una vez por semana en los esterilizadores de vapor; en cada ciclo de esterilizadores de gas; así como un indicador químico en cada paquete de cada ciclo.

■ Las tiras DUO-SPORE de PROPPER están formadas de esporas en estado latente de poblaciones estandarizadas de *Bacillus Stearothermophilus* y *Bacillus Subtilis* var. *Niger* (Globigii), obtenidos de cultivos oficiales de las colecciones de cultivo de tipo americano.



No. Referencia	Description
269065	Indicadores biológicos para el control de efectividad, en los procesos de esterilización de: Vapor (desplazamiento de gravedad y alto vacío), Gas Oxido de Etileno y de Calor Seco. Cantidad: 25 juegos por caja.

propper

Long Island City, N. Y. 11101

SUPERVISOR

DUO-SPORE®

INSTRUCTIONS FOR USING BIOLOGICAL
OF GAS STEAM OR DRY
ORGANISMS: *BACILLUS SUBTILIS* var. *NIGER*
The part of envelope contains two test indica-
tors

SUPERVISOR

Instructions for Monitoring

1. Include the two test strips from this pocket within pack or materials to be sterilized, and locate in the most difficult area to be sterilized by the sterilization agent used.
2. Sterilize according to normal procedure.
3. Fill in data required on other side of this envelope.
4. After sterilization, remove both strips from the pack, place them in this pocket of the envelope and send to Bacteriology Laboratory for testing.

88DS 12/88

Lot No.

Expires

Store at ambient conditions, remote from E.O.
gas. After expiration date, incinerate.

INDICATORS TO DETERMINE EFFICIENCY
OF HEAT STERILIZATION

(*BACILLUS SUBTILIS* and *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*)

This part of envelope contains one control in-
dicator

BACTERIOLOGIST

Instructions for Culturing

1. Aseptically cut open the glassine envelope.
2. Place each test strip and control strip in individual test tubes of tryptic soy broth (density at bottom).
3. Incubate overnight at normal temperature.
4. Reheat for steam sterilization at 121°C for Ethylene Oxide, dry heat, and radiation sterilization.
5. See sterilization test data on other side of envelope for sterilizing agent used.
6. Observe tubes daily for growth. Growth should occur on unsterilized control within 48 hours.
7. Record results on reverse side of this envelope and return to supervisor who issued the test.
8. Where test is completed, indicate positive cultures.

BACTERIOLOGIST

DUO-SPORE®

BACTERIOLOGY CULTURE
REPORT

Date strips cultured 26-03-86

Control strip Observed growth in 1 day.

Test strip #1 No growth
 Growth observed in _____ day.

Test strip #2 No growth
 Growth observed in _____ day.

Incubated at 37°C
 55°C

Observed growth was checked microscopically and gram stained.

Signature Margarita Teran
Date 02-12-86

STERILIZATION REPORT

Institution CHINDIN SAC

Date of Cycle 26-03-86

Sterilizer Autoclave "A"

Cycle # 2

Indicator location #1 E-5
#2 F-6

Sterilization Conditions
 STEAM ETHYLENE OXIDE
 Dry Heat Other

Temperature 121°C

Exposure Period 30 minutes

Signature J. J. Quayle
Department Injectables

PROPPER MANUFACTURING CO., INC.
LONG ISLAND CITY, NEW YORK 11101

BACTERIOLOGIST

DUO-SPORE®

BACTERIOLOGY CULTURE
REPORT

Date strips cultured 26-03-86

Control strip Observed growth in 1 days

Test strip #1 No growth
 Growth observed in _____ days

Test strip #2 No growth
 Growth observed in _____ days

Incubated at 37°C
 55°C

Observed growth was checked microscopically and gram stained.

Signature Margarita Teran
Date 02-12-86

STERILIZATION REPORT

Institution CHINDIN SAC

Date of Cycle 26-03-86

Sterilizer Autoclave "A"

Cycle # 2

Indicator location #1 H-8
#2 K-11

Sterilization Conditions
 STEAM ETHYLENE OXIDE
 Dry Heat Other

Temperature 121°C

Exposure Period 30 minutes

Signature J. J. Quayle
Department Injectables

PROPPER MANUFACTURING CO., INC.
LONG ISLAND CITY, NEW YORK 11101



duo-spore® data card

Each Spore Strip is impregnated with:
 1.2×10^6 spores of *Bacillus stearothermophilus*
 4.3×10^6 spores of *Bacillus subtilis* var. *niger* (globigii)

Recommended Culture:
soybean casein digest (tryptic soy broth)

Storage:
Keep away from heat and ethylene oxide

Disposal:
Autoclave or incinerate

Lot No. 0125 Expiration Date 12/73

Bacillus stearothermophilus approx. D_{121} value 2.6 min
Bacillus subtilis var. *niger* approx. D_{121} value 3.0 min
 (600 mg/L EO 54°C 60% RH)

Agent	Conditions	Resistance Parameters		
		Survives	Killed	Incubate
EO	600 mg/L 60% RH 54°C	15 min	120 min	37°C
Steam	121°C (250°F)	5 min	15 min	55°C
Steam	131°C (272°F)	1.3 min	2 min	55°C
Dry Heat	171°C (320°F)	29 min	—	37°C
	182°C (358°F)	—	120 min	37°C

Propper Manufacturing Co., Inc., 26-04 Williams Avenue, Long Island City, New York 11101

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y MEMOROGRAFICAS

- 1) Hardwidge, E.A., et.al., "Validation of Filtration Processes Used for Sterilization of Líquids," J. Parenteral Sci. Technol. 38(1): 37-43 (1984).
- 2) Hoffman, F., "Integrity Testing of Microfiltration Membranes," J. Parenteral Sci. Technol. 38(4): 148-158 (1984).
- 3) Tolliver, D.L., and Schroeder, H.G., "Particle Control in Semiconductor Process Streams," Microcontamination. June/July, 11 pp. (1983).
- 4) Parenteral Drug Association, Inc., "Validation of Aseptic Filling - for Solution Drug Products," (Technical Monograph No. 2), 23 pp. (1980).
- 5) Chapman, K.G., "A Suggested Validation Lexicon," Pharm. Technol. 7(8): 51-55 (1983).
- 6) Ylla-Catalá, M., "La Validación: un reto actual- Normas para la --- práctica de una correcta validación," C.I.F. 2(1): 25-28 (1983).
- 7) Tetzalaff, R.F., "Systems Validation for Parenteral Clinical Drugs -Application to R&D and QC Laboratories," J. Parenteral Sci. Technol. 37(2): 45-50 (1983).
- 8) Sharpe, J., "Process Validation," Manufacturing Chemist. 58(8): 33, 35 (1982).
- 9) U.S. Pharmacopeia XXI Revision, Sterilization by Filtration, Pg. --- 1350; U.S.P. Convention, Inc. Rockville, Md. (1985).
- 10) Wrasidlo, W., and Mysels, K., "The Structure and Some Properties of Graded Higly Asimmetrical Porous Membranes," J. Parenteral Sci. Technol. 38(1): 24-31 (1984).
- 11) Schroeder, H.G., and Deluca, P.P., "Theoretical Aspects of Sterile Filtration and Integrity Testing," Pharm. Technol. 4(11): 80-85 (1980).
- 12) Olson, W.P., "Validation and Qualification of Filtration Systems for Bacterial Removal," Pharm. Technol. 6(11): 85-92 (1979).

- 13) Leahy, T.J., and Sullivan, H.J. "Validation of Bacterial Retention Capabilities of Membrane Filters," Pharm. Technol. 2(11): 65-75 (1978).
- 14) Helman, J. Farmacotecnia Teórica y Práctica, TOMO III (Filtración) y TOMO IV (esterilización), México, C.E.C.S.A., 1981
- 15) Osol, A. (Editor). Remington's Pharmaceutical Sciences. 16a. ed. Mack Pub. Co., Easton Pennsylvania, E.U.A., 1980.
- 16) Brunswick Technetics. Procedimientos de Esterilización y Prueba de Cartuchos de Clasificación Biológica. Brunswick Technetics, Membrane Filter Products, San Diego CA, 1982.
- 17) Brock, Thomas D. Membrane Filtration. Madison WI 53706 U.S.A., Science Tech. Inc., 1983.
- 18) Health Industry Manufacturers Association., "Microbiological Evaluation of Filters for Sterilizing Líquids," HINA Document No. 1, Vol. 4, Washington DC, (1982).
- 19) British Pharmacopeia Vol. II, A 197. Appendix XVIII B.
- 20) Johnston, P.R., and Meltzer, T.H., "Suggested Integrity Testing of Membrane Filters at a Roboust Flow of Air." Pharm. Technol. 4(11): 49-59 (1980).
- 21) Johnston, P.R., Lukaszewics, R.C., and Meltzer, T.H., "Certain Imprecisions in the Bubble Point Measurement," J. Parenteral Sci. Technol., 35(1): 36-39 (1981).
- 22) Reti, A.R., "An Assessment of Test Criteria in Evaluating the Performance and Integrity of Sterilizing Filters," Bull. Parenteral Drug Assoc., 31(4): 187-194 (1977).
- 23) Cole, J., and Pauli, W., "Field Experience in Testing Membrane Filter Integrity by the Forward Flow Test Method," Bull. Parenteral Drug Assoc., 29(6): 296-304 (1975).

- 24) Olson, W.P., "A System for Integrity Testing of Disc and Cartridge Membrane Filters," Pharma. Technol., 6(5); 42-52 (1982).
- 25) Olson, W.P., Martinez, E.D., and Kern, C.R., "Diffusion and Bubble Point Testing of Microporous Cartridge Filters: Preliminary Results at Production Facilities," J. Parenteral Sci. Technol. 35(5): 215-222 (1981).
- 26) Lukaszewicz, R.C., Tanny, G.B., and Meltzer, T.H., "Membrane Filter Characterization and Their Implications for Particle Retention," Pharm. Technol., 2(11): 77-82 (1978).
- 27) Tanny, G.B., Strong, D.K., Presswood, W.G., and Meltzer, T.H., "The Absorptive Retention of Pseudomonas diminuta by Membrane Filters" J. Parenteral Drug Assoc., 33(1): 40-51 (1979).
- 28) Pérez, A.N. Cómo hacer mi tesis. 2ª ed., Edicol, México, 1983.
- 29) Pelczar, M.J., et. al. Microbiología. 2ª ed. en español, Mc Graw Hill, México, 1982.
- 30) Duberstein, R., "Mechanisms of Bacterial Removal by Filtration," J. Parenteral Drug Assoc., 33(5): 250-256 (1979).
- 31) Reti, A.R., Leahy, T.J., "Validation of Bacterially Retentive Filters by Bacterial Passage," J. Parenteral Drug Assoc., 33(5): 257-272 (1979).
- 32) Tasen, B., "Non-Destructive Test for Bacterial Retentive Filters," J. Parenteral Drug Assoc., 33(5): 272-279 (1979).
- 33) Brooks, N., "Synopsis of the P.D.A. Panel on Filter Validation," J. Parenteral Drug Assoc., 33(5): 280-282 (1979).
- 34) Couriel, D.B. (Editor). Validación de Procesos Farmacéuticos. Asociación Farmacéutica Mexicana A.C. - Centro Mexicano de Inves-

tigación Farmacéutica - 1982.

- 35) Wallhäusser, K.H., "Is the Removal of Microorganisms by Filtration Really a Sterilizing Method," J. Parenteral Drug Assoc., Vol. 33, pp. 156-170 (1979).
- 36) Richards, J.W. Introduction to Industrial Sterilization, Academic Academic Press, London, 1980.
- 37) "Standard Method of Test for Pore Size Characteristics of Membrane Filters for Use with Aerospace Fluids," ASTM Designation F 316-70 American Society for Testing and Materials, 1970.
- 38) Pall, D.B., "Quality Control of Absolute Bacterial Removal Filters," Bull. Parenteral Drug Assoc., Vol. 29, pp. 192-204, (1975).
- 39) Real Academia Española. Diccionario de la Lengua Española, 19ª ed., Espasa-Calpe, España, 1981.
- 40) Marshall, J.C., and Meltzer, T.H., "Certain Porosity Aspects of Membrane Filters: Their pore distributions and anisotropy," Bull. Parenteral Drug Assoc., 30: 214-225 (1976).
- 41) Reti, A.R., "An Assessment of Test Criteria in Evaluating the Performance and Integrity of Sterility Filters," Bull. Parenteral Drug Assoc., 36: 187-194 (1974).
- 42) Aerospace Recommended Practice, ARP-901 "Bubble Point Test Method," issued March 1, 1968, Society of Automotive Engineers.
- 43) Howard, G., and Duberstein, R., "A Case of Penetration of 0.2- μ m Rated Membrane Filters by Bacteria," J. Parenteral Drug Assoc., 34(2): 95-102 (1980).
- 44) Lukaszewicz, R., and Meltzer, T. "Concerning Filter Validation," J. Parenteral Drug Assoc., 33(4): 187-194 (1979).
- 45) Bowman, F.W., Calhoun, M.P., and White, M., "Microbiological Methods for Quality Control of Membrane Filters," J. Pharmaceutical Sci., 56,222 (1967).

- 46) Olson, W.P., Gatlin, L.A., and Kern, C.R., "Diffusion and Bubble Point Testing of Microporous Cartridge Filters: Electromechanical Methods," J. Parenteral Sci. Technol., 37(4): 117-123 (1984).
- 47) "Current Good Manufacturing Practices in Manufacturing, Processing, Pack and Holding Drugs" Federal Register, 43, 45076-45087, (1978).
- 48) Meltzer, T.H., and Meyers, T.R., "The Bubble Point in Membrane Characterization," Bull. Parenteral Drug Assoc., 25, 165-173 (1971).
- 49) Zierdt, C.H., "Adherence of Bacteria, Yeast, Blood Cells, and Latex Sphers to Large-Porosity Membrane Filters," Appl. Environ. Microbiol., 38(6): 1166-1172 (1979).
- 50) Johnston, P.R. and Meltzer, T.H., "Comments on Organism-Challenge Levels in Sterilizing-Filter Efficiency Testing," Pharm. Technol., November 1979, 66-70 (1979).
- 51) Cardenas, J.M. Procesos de Filtración Estéril. Seminario Impartido en el Instituto Mexicano de Capacitación y Adiestramiento de la Industria Farmacéutica y Químico Farmacéutica, México, Noviembre 1984.
- 52) Cardenas, J.M., Carreón, O.H., y Couriel, B.D. Validación de Areas Estériles. Seminario Impartido en el Instituto Mexicano de Capacitación y Adiestramiento de la Industria Farmacéutica y Químico Farmacéutica, México, Junio 1985.
- 53) Sartorius, Inc. Diversos Tipos de Membranas Filtrantes, sus Características y Diferencias. Yaucí, Puerto Rico, 1985.
- 54) Turco, S. and King E.R. Sterile Dosage Forms. 2nd Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, E.U.A., 1979.
- 55) Ibañez, S. Sánchez, J., Avilés, I. y Fernández, J.M. "Preparación de Formas de Dosificación Líquidas Estériles," Revista de la Asociación Española de Farmacéuticos de Hospitales., Vol. VIII, No. 1, pp. 69-84 (1984).

- 56) Tanny, G.B., and Meltzer, T.H., "A Review of Sterilization with Membrane Filters," Pharm. Technol., July 1979, 44-49 (1979).
- 57) Lukaszewicz, R.C. and Fisher, R., "Mechanisms of Membrane Filtration for Particulate and Microbiological Retention in Critical Applications," Pharm. Technol. June 1981, (1981).
- 58) Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas - Asociación Farmacéutica Mexicana. Guía Para Efectuar Prácticas Correctas de Manufactura En La Industria Farmacéutica, México, 1983.