

25  
24



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

"VALIDACION DEL PROCESO DE LLENADO ASEPTICO  
DE UNA SUSPENSION INGERIBLE"

## TESIS MANCOMUNADA

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N :

RODOLFO EMIGDIO MARTINEZ QUIROZ  
ESTEBAN JAIME HERNANDEZ ZAMORA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III. OBJETIVO	4
IV. HIPOTESIS	5
V. FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA	6
VI. CRITERIOS DE ACEPTACION	45
VII. MATERIALES	47
VIII. METODOS	50
IX. RESULTADOS	65
X. DISCUSION DE RESULTADOS	86
XI. CONCLUSIONES	88
XII. RECOMENDACIONES	90
XIII. BIBLIOGRAFIA	91

## I. INTRODUCCION

La evolución y mejoramiento constante del control de los procesos farmacéuticos ha permitido establecer la "validación de procesos farmacéuticos" como medida preventiva de errores que se reflejan en una productividad constante y una calidad confiable que beneficia al consumidor al ofrecerle medicamentos que cumplen su función terapéutica.

Es en 1976 cuando surge la validación de procesos como una propuesta realizada por FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) aplicada a procesos de esterilización y dirigida a garantizar la calidad de los productos, lo cual es política de cualquier industria farmacéutica, por lo que su aceptación es inmediata(1)

La validación de procesos involucra un análisis de todos los factores que afectan cada etapa del proceso de producción así como de la efectividad de los métodos de control de procesos, esto asegura que cada unidad de dosificación elaborada cumpla con las características de calidad diseñadas, es decir, se construye la calidad de manera reproducible, en vez de controlarse.

Dentro de los procesos farmacéuticos existentes el llenado aséptico de una suspensión ingerible es uno de los más exigentes, por lo que se debe establecer su validación como método de control total que permita obtener un producto cuya característica de calidad principal es la pureza, factor indispensable para comercializar la suspensión ingerible,(2).

La validación de procesos es una concertación de esfuerzos que involucra los siguientes elementos,(3):

- a) Instituciones de educación superior, que preparan los futuros profesionales en este tema.
- b) Compañías farmacéuticas, que se encargan de preparar la infraestructura organizacional y tecnológica, capacitar al personal y preparar los planes de validación de procesos.
- c) Asociaciones profesionales, que colaboran en la actualización y capacitación de los farmacéuticos y demás profesionales que estén relacionados con el desarrollo, producción y control de los medicamentos.
- d) Gobierno, el cual prepara la reglamentación necesaria considerando los puntos de vista de las 3 áreas mencionadas previamente, actualizarla, propiciar su difusión y aplicación progresiva.

La validación es un campo fértil en el que se tiene que trabajar constantemente, los frutos se reflejan en la calidad de los productos farmacéuticos.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que las características de la suspensión ingerible no permiten una esterilización terminal se plantea realizar su llenado en condiciones asépticas con la finalidad de mantener la calidad establecida durante el diseño del producto; para controlar el llenado aséptico de la suspensión ingerible es necesario realizar su validación con el fin de establecer su confiabilidad, efectividad y reproducibilidad con lo que se obtiene la calidad, seguridad y funcionalidad del producto, (4). La validación involucra el control de aquellos factores que afectan el llenado aséptico y las características del producto, la finalidad del presente trabajo es establecer los estándares de operación de los factores críticos del proceso de llenado aséptico, evaluando los siguientes: la llenadora de ampollitas y el tanque contenedor a los que se les realiza su calificación operacional y de instalación, validación del proceso de esterilización, calificación de área aséptica, eficacia de sanitizantes, calidad microbiológica del aire comprimido filtrado, características de los acabados de pisos, paredes y techos del área aséptica, características de utensilios para limpieza de área, constitución y manejo de uniformes y personal capacitado, esto permitirá obtener el producto con la calidad diseñada, (5).

### III. OBJETIVO.

#### Objetivo (s):

El objetivo del presente trabajo es proporcionar la evidencia documental, para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad del proceso de llenado aseptico, de una suspensión ingerible en ampollitas dentro de un área aséptica llevando a cabo simulaciones del proceso con un medio de cultivo, y evaluando cada uno de los factores críticos del proceso, verificando que las condiciones de trabajo que se realizan garantizan la calidad de diseño del producto.

#### IV. HIPOTESIS

**Hipótesis de trabajo:**

Si durante el llenado aséptico, de la suspensión ingerible, se cumple con todas las condiciones de operación requeridas el proceso cumplirá con la validación y dará un producto con la calidad diseñada, (6).



## V. FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA

La industria farmaceutica ha tenido un gran desarrollo en las últimas tres décadas. esto le permite un mejor control de los procesos de producción, a través de implantación de técnicas y métodos más efectivos. La preocupación por mantener este desarrollo a dado origen a grandes avances en el diseño y construcción de la calidad, uno de ellos es la validación que se aplica a todos los procesos de producción y en especial a aquellos que requieren un control estricto, este es el caso del llenado aseptico de una suspensión ingerible en un área aseptica. La validación implica la aplicación del método científico para proporcionar la evidencia documental que demuestre la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de una operación o proceso (7).

La validación del llenado aseptico permitirá su control dando en consecuencia una evidencia documentada de que el llenado es confiable, efectivo y reproducible: Confiable porque permite tener un gran porcentaje de seguridad de que el proceso se comporta de acuerdo a su diseño: Efectivo porque da resultados reales que se traducen en un incremento de producción sostenido disminuyendo con esto, los costos de producción: Reproducible porque permite operar el proceso bajo condiciones estándar, limitando con esto, las variaciones que presenta. La validación de procesos viene a ser la meta de muchas industrias farmaceuticas para mantener la calidad, funcionalidad y seguridad

de sus productos, basado en un control total del proceso y cumpliendo a la vez, con un requisito que se desprende de la ley general de salud, de su reglamento y de los procedimientos adecuados de manufactura vigentes para productos farmacéuticos.

Dentro de las principales ventajas que se obtienen al validar el llenado aseptico de una suspensión ingerible en un área aseptica se encuentran los siguientes: reducción de costos de producción, al reducir paros en línea y tiempos muertos, reduce la dependencia de pruebas de producto en proceso, permitiendo un ahorro de reactivos analíticos, equipos y horas hombre sin embargo, esto no excluye las pruebas a producto terminado las cuales determinan su salida al mercado, (8).

La necesidad del llenado aseptico de la suspensión, ingerible se desprende principalmente de sus características dado que su formulación contiene sustancias nutritivas como: fosfatos, carbohidratos, fuentes de nitrógeno y sales minerales, que son aprovechadas fácilmente por diversos microorganismos, principalmente fermentativos, esto no origina, sólo la descomposición del producto sino, también, efectos nocivos en el paciente, caracterizados principalmente por la implantación de microorganismos patógenos en vez de la reconstitución de la flora intestinal normal, finalidad del producto. La validación del llenado aseptico de una suspensión ingerible involucra el análisis de todos aquellos factores que influyen en el llenado y ponen en peligro las características de calidad del producto, los más criticos son los siguientes, (9): [Equipos, autoclave, cuyo

funcionamiento adecuado permite la esterilización de materiales empleados dentro del área aséptica, con esto se evita que los constituyentes de la suspensión ingerible sean aprovechados por otro tipo de microorganismos lo cual contaminaría el producto, además, una adecuada esterilización de materiales ayuda a mantener el control microbiológico dentro del área aséptica, el tanque contenedor, que aísla del medio ambiente a la suspensión ingerible y la mantiene con agitación y presión establecidas durante el llenado, la llenadora de ampollitas, cuyo ajuste de todos sus sistemas permite un sellado aséptico de los contenedores primarios.

Sistemas: filtración de aire comprimido, del que depende la calidad microbiana del aire utilizado para la agitación, control ambiental, del que depende la clase de área y brinda un soporte confiable a los procesos asepticos, sanitización, de cuya efectividad depende el control microbiológico del área aséptica.

Área aséptica: que es una zona delimitada por paredes, techo, piso y accesos, en la cual se tiene un estricto control sobre la cantidad de material particulado (microbiológico o no) presente así como de las condiciones de humedad relativa y sobre presión requeridas para los procesos que en el se llevan a cabo. Materiales: contenedor primario, de cuya esterilidad depende la estabilidad de la suspensión ingerible, uniformes, cuya composición y esterilidad pueden alterar las características del área aséptica dado que son fuente de contaminación. Utensilios de limpieza: cuya constitución debe evitar el desprendi-

miento de partículas de cualquier naturaleza durante su uso. Sustancias limpiadoras: no deben ser tóxicas y de fácil desarrollo como detergentes, jabones etc. Por último se debe considerar al personal el cual debe ser capacitado para evitar el máximo que sea una fuente de contaminación y asegurar el aprovechamiento de sus habilidades. Por lo tanto la validación del llenado aseptico de la suspensión ingerible en un Área aseptica es la herramienta que permite armonizar todos estos factores para establecer un proceso confiable, eficaz y reproducible, (10).

Los factores críticos del proceso de llenado aseptico se enlistan a continuación:

- V.1. Capacitación de personal.
- V.2. Calificación de Área aseptica.
- V.3. Servicios.
  - V.3.1. Esterilización de aire comprimido.
  - V.3.2. Agua para uso farmacéutico.
- V.4. Características de las mangueras.
- V.5. Uniforme de Área aseptica.
- V.6. Sanitización de Área aseptica.
  
- V.7. Equipos.
  - V.7.1. Validación del proceso de esterilización en autoclave, ( calor húmedo ).
  - V.7.2. Realización y comprobación de la esterilización del tanque contenedor.
  - V.7.3. Determinación de la capacidad de proceso de la llenadora de ampollitas.

## V.1. CAPACITACION DE PERSONAL.

Es uno de los factores más importantes para tener un proceso controlado y llegar a validarlo ya que debe realizar todas las actividades relacionadas con la producción y su control por lo cual debe conocer lo siguiente:

- a) Operaciones a efectuar; se debe explicar claramente al personal las actividades a realizar, evitando acciones que no se relacionen con la producción y su control.
- b) Uso y manejo de uniforme; se deben realizar varias demostraciones de como debe vestirse el uniforme sin contaminarlo dado que este tiene contacto con el ambiente del área aseptica.
- c) Desplazamiento del personal; todos los movimientos que se realizen dentro del área deben de ser lentos para evitar al máximo el desprendimiento de partículas existentes en el uniforme, además los movimientos lentos permiten mantener el flujo laminar, barrera importante contra la contaminación durante el llenado.
- d) Deben manejar situaciones de emergencia como; fallas en la corriente eléctrica, incendio, explosión interna o externa, ruptura de garrafones que contengan tanto materiales tóxicos como no tóxicos.
- e) Salud del personal; se debe gozar de buena salud

para laborar dentro del área aseptica, para evitar una fuente potencial de contaminación.

- f) Técnicas de desinfección: la difusión de los diferentes desinfectantes utilizados en el área aseptica se debe realizar entre todo el personal que al aplicarlas ayuda a mantener el ambiente estéril.
- g) Limpieza del área: con la ayuda de audiovisuales se debe explicar al personal la forma correcta de realizar la limpieza del área, equipo e instrumentos.
- h) Aseo personal: el personal debe bañarse antes de entrar al área aseptica y no portar pulseras, anillos, cadenas y relojes, además debe evitar el uso de cosméticos, barniz de uñas y spray para el cabello.

Se debe de revisar el programa de capacitación para asegurar que el personal que lleva a cabo los procedimientos de control y producción tengan experiencia y conocimiento adecuado para realizar estas funciones, (11).

## V.2. CALIFICACION DE AREA ASEPTICA.

El área aseptica es una zona delimitada por paredes, techos, pisos y accesos en la cual se tiene un estricto control sobre la cantidad de material particulado (microbiológico o no) presente, así como de las condiciones de temperatura, humedad relativa y sobrepresión requerida para los procesos que en ella se realizan, (12).

### V.2.1. CARACTERISTICAS DEL AREA ASEPTICA.

Las superficies de pisos, paredes y techos deben ser lisas sin depresiones o huecos, las uniones pared - piso, pared - techo, pared - pared, deben tener terminación curva sanitaria que facilita su limpieza, las terminaciones de estas superficies deben resistir la acción de agentes químicos, desinfectantes y fumigantes esto evita la liberación de material particulado. Las puertas y ventanas deben estar emparejadas con las paredes y ser de superficie lisa, esto reduce las regiones que pueden acumular contaminantes, sus materiales de construcción soportan la acción de agentes químicos, desinfectantes, de fumigantes y de limpieza, las ventanas no se podrán abrir.

Las tuberías de agua, aire a presión, gases butano y oxígeno, así como los ductos con cables de energía eléctrica e inyección de aire deben estar instalados ocultamente y no invadir partes expuestas de paredes, pisos y techos. En el área únicamente quedarán expuestas las salidas de estos servicios, los

difusores de entrada de aire y las rejillas de retorno quedarán al mismo nivel del techo.

La función primordial del área aseptica es mantener un control sobre la cantidad de material particulado y microorganismos, que se encuentran en el ambiente donde se realiza el proceso de llenado, de esta forma disminuye las posibilidades de contaminación y permite asegurar el llenado de la suspensión ingerible dando un producto puro.

La clase de Área se establece con base a las características del producto, del proceso y al confort de los operarios, debido a que en este proceso de llenado el área, que tiene contacto con el producto y contenedor primario, se considera como "AREA CRITICA", esto origina que se tenga un Área CLASE 100 para la realización del proceso y en sus alrededores se tiene Área clase 1000.

El área clase 100 tiene un máximo de 100 partículas por pie cúbico las cuales pueden ser viables o no viables como microorganismos, polvo o pelusa, todas ellas son detectadas a través de un monitoreo que se realiza en las superficies expuestas de los filtros absolutos utilizando un contador de partículas cuya sensibilidad permite detectar partículas hasta de 0.01 micras. El área clase 1000 tiene un máximo de 1000 partículas por pie cúbico, esta clase se utiliza en áreas que no son críticas al igual que las áreas clase 10000 existentes en exclusas y accesos.



## V.2.2. SISTEMA DE ALIMENTACION DE AIRE.

El sistema de alimentación de aire del área aseptica debe cumplir con los siguientes puntos:

- a) El aire debe ser inyectado por un ventilador centrifugo o por cualquier otro sistema.
- b) Se recomienda utilizar un prefiltro para particulas de 12 micras en adelante y con una eficiencia del 1000 % .
- c) Se recomienda utilizar un segundo prefiltro para particulas de 5 micras en adelante con una eficiencia del 100 %.
- d) Por último se debe utilizar un filtro de alta eficiencia con una retención de 99.97% para particulas mayores a 0.3 micras.

El aire se debe inyectar originando un flujo turbulento que barra toda el área aseptica dando una presión positiva con respecto a las áreas adyacentes, evitando la entrada de particulas o microorganismos contaminantes. Las máquinas llenadoras son bañadas por un módulo de flujo laminar el cual toma aire limpio tanto de la cámara plena como del aire inyectado al área aseptica. El flujo laminar es una cortina de aire vertical que fluye en forma paralela a una velocidad de 117 pies /min. critica de llenado.

#### V.2.3. MONITOREO MICROBIOLÓGICO DEL AREA ASEPTICA.

Se deben realizar monitoreos microbiológicos del Area aséptica para conocer el nivel de contaminación, de tal forma, que esta se mantenga dentro de los límites establecidos para la clase de área.

### V-3. SERVICIOS.

#### V-3-1. ESTERILIZACION DE AIRE COMPRIMIDO.

##### V-3-1-1. SISTEMA DE FILTRACION.

El aire comprimido no filtrado contiene microorganismos como virus, bacteriofagos y bacterias, que tiene un tamaño que oscila entre 0.01 y 2 micrones, sino se eliminan al 100%, se contamina el producto con el que tiene contacto directo, (13).

El control del aire comprimido empieza desde el diseño del sistema de filtración, el cual involucra considerar los siguientes aspectos:

- a) Todos los microorganismos vivos, como bacterias, bacteriofagos y virus deben ser filtrados al 100%.
- b) El medio filtrante debe estar diseñado de tal manera que no deje crecer a las bacterias en él, ni a su paso por él. No debe perder calidad en los distintos ciclos de esterilización al vapor, a menudo con temperaturas superiores a los 200°C.
- c) El elemento filtrante debe de ser capaz de soportar los continuos golpes de presión ocasionados por las válvulas de apertura rápida permitiendo pasar casi instantáneamente de caudal nulo a máximo caudal.
- d) El aire debe quedar exento de aceite, agua, suciedad, de todo gas hidrocarbónico y de olores orgánicos.

Un ejemplo de un sistema de filtración de aire que

permite obtener aire estéril es el siguiente: el aire comprimido debe pasar por el filtro 1 el cual debe eliminar las partículas más grandes el agua y el aceite, ver figura 1.

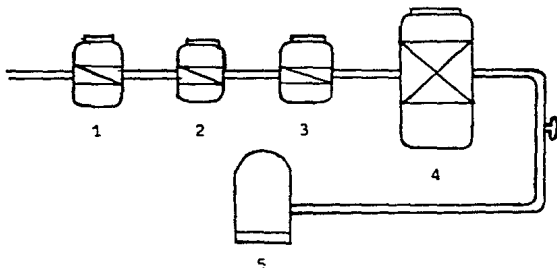


Figura 1. Ejemplo de un sistema de filtración.

El aire debe pasar después a través del filtro número 2 donde se eliminan las restantes partículas y donde por coalescencia los aerosoles de aceite y agua finamente divididos se convierten en líquidos y se separan del aire. En seguida el aire limpio y seco pasa a través del filtro número 3 de carbón activo el cual permite una adsorción de gas, en dos etapas de adsorción, la primera etapa consta de un difusor en forma de estrella permeable, lleno de carbón activo. Este difusor retarda la marcha del aire y lo distribuye a través del lecho granulado adsorbiendo las moléculas de los hidrocarburos. El aire debe pasar directamente a la segunda etapa que tiene carbón muy finamente dividido en un medio filtrante de alta eficiencia, ver figura 2.

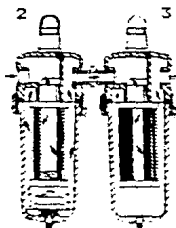


Figura 2. Paso del aire a través de los filtros 2,3.

Cuanto más pequeños son los gránulos, disponen de mayor superficie, con lo que se asegura la adsorción de todas las restantes moléculas de gas.

El aire pasa por un cuarto filtro, el cual es de esterilización y permite obtener aire comprimido 100% estéril. Por último el aire debe pasar a través de un filtro membrana que retiene cualquier microorganismo y/o partícula en caso de que existiera en el aire filtrado, ídem obcit página 15.

#### V-3-1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS FILTROS PARA AIRE ESTÉRIL.

Deben tener un medio filtrante de microfibras tridimensional sin aditivos, los medios filtrantes son hidrófobos por estar fabricados con fibra de material inorgánico, esto elimina los cambios en el material provocados por la presencia de agua, ver figura 3.

El medio filtrante no debe romperse, descomponerse ni ser destruido por medio alguno, los elementos filtrantes resis-

tirán repetidas esterilizaciones al vapor a alta presión y temperaturas superiores a los 200°C.

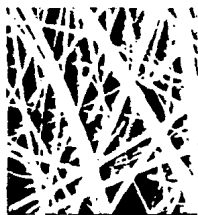


Figura 3. Medio filtrante tridimensional de microfibras.

En su funcionamiento el aire pasa de afuera hacia dentro a través del elemento filtrante, los microorganismos y partículas inferiores a 1 micrón quedan atrapadas en la etapa de prefiltro, después el aire pasa por el medio tridimensional de microfibras donde queda retenida la contaminación restante. El medio filtrante es completamente inerte y libre de todo adhesivo de resina, teniendo una excelente resistencia química, las bacterias no pueden crecer ni atravesarlo, quedando retenidas en él, la construcción tipo sandwich es apoyada por el manguito, soporte de acero inoxidable lo que permite que el aire fluya en uno y otro sentido, ver figura 4.

Retienen partículas desde 0.01 micras en adelante, la eficacia de la filtración es del 100 % aún en caudales de 1% a 200% del caudal estimado, ídem *obcit* página 15.

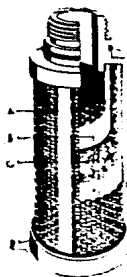


Figura 4. Partes integrantes de los filtros,1,2,3,4.  
 A-Manguito de ac. inoxidable.B-Primera etapa:prefiltro.C-Segunda etapa:medio filtrante de microfibra tridimensional.D-Sello.

#### V.3.1.3. CARACTERISTICAS DE LOS FILTROS MEMBRANA.

Son membranas de difluoruro de polivinil modificado hidrofóbico con una estructura soporte de polisulfona y doble disco de silicón, fijados en un cartucho.

Los cartuchos son diseñados para la remoción de microorganismos y partículas de gases. Los cartuchos pueden ser esterilizados de varias formas, en autoclave con vapor o sanitización química. La membrana de naturaleza hidrofóbica de una sola capa no bloqueará el aire después del autoclaveado o del paso de vapor, por lo que el flujo de aire no se verá obstaculizado incluso en altas humedades. El cartucho contiene 2 membranas circulares que se pegan a un soporte rígido, una de cada lado.

La filtración es de alta eficiencia a través de membranas planas, los cartuchos pueden ser retados para las siguientes pruebas:

- a) Retención de bacterias con *Pseudomonas diminuta* en cantidades de  $10^7$  /cm<sup>2</sup>.
- b) Habilidad para ser esterilizada por vapor a 138°C en línea o autoclave.
- c) No pirógenos.
- d) Niveles de extractables total.

Los materiales de construcción inerte aseguran el mínimo de extractables y la preservación de la pureza del producto. El cartucho puede trabajar confiablemente a una presión de 4.1 Kg./cm<sup>2</sup> y a temperaturas mayores a 90°C.



### V.3.2. AGUA PARA USO FARMACEUTICO.

Tipos de agua: la farmacopea clasifica diferentes tipos de agua que en general presentan las características indicadas en la tabla número 1. Agua purificada; representa un material empleado como ingrediente, mientras que los demás representan en sí, preparados farmacéuticos, (13).

Debido a que el agua purificada puede poseer diferentes cargas microbianas dependiendo de su método de obtención, distribución y/o almacenamiento, se hace menester establecer criterios generales para practicar las acciones correctivas necesarias cuando estas sean requeridas. En general, debe considerarse que todo método empleado para el tratamiento y purificación del agua debe ser diseñado, certificado y validado antes de iniciar su operación, y controlado adecuadamente durante su proceso, de manera que se garantice la obtención de agua con la calidad tanto química como física y microbiológica deseada.

La carga microbiana aeróbica máxima admisible en los puntos de uso del agua para uso farmacéutico es de 500 unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml, mientras que la de agua purificada es de 800 UFC por 100 ml y la de agua para fabricación de inyectables es de 50 UFC por 100 ml. En todos los casos anteriores no deberá haber presencia de microorganismos patógenos.

Las cargas microbianas anteriormente citadas pueden

ser empleadas como referencia para establecer el procedimiento general de tratamiento y/o purificación de agua, que al salir de especificaciones, se requiere la aplicación de una acción correctiva. Necesariamente, la validez de dicha acción correctiva deberá ser corroborada. Es de primera importancia que el empleo de dichas acciones no sustituya, sino sea parte del sistema general de buenas prácticas de manufactura.

V.3-2.1. TIPOS DE AGUA PARA USO FARMACEUTICO.

TIPO	METODO DE PREPARACION	APIROGENICA (1)	CARGA MICROBIANA
Agua purificada	Destilación, métodos de intercambio iónico u ósmosis inversas.	no	No más de 800 UFC por 100 ml (mesófilos aerobios no patógenos)
Agua para la fabricación de inyectables.	Destilación u ósmosis inversa.	si	No más de 50 UFC por 100 ml (mesófilos aerobios no patógenos).
Agua inyectable. (2)	Destilación u ósmosis inversa, esterilización y empaque.	si	Pasa la prueba de esterilidad. MGA 0381
Agua bacteriostática para inyectables.	Destilación u ósmosis inversa, adicionada de agentes bacteriostáticos, esterilización y empaque	si	Pasa la prueba de esterilidad. MGA 0381
Agua estéril para irrigación.	Destilación u ósmosis inversa, esterilización y empaque.	si	Pasa la prueba de esterilidad. MGA 0381

Tabla 1

- (1) Ausencia de endotoxinas capaces de provocar una reacción febril.
- (2) No adecuada para administración intravascular a menos que se haya hecho isotónica.

#### V.4. CARACTERISTICAS DE LAS MANGUERAS.

Mangueras utilizadas para transportar la suspensión ingerible del tanque contenedor a la llenadora de ampollitas. El material de construcción debe cumplir con las siguientes características:

- No ser contaminante.
- Aguantar temperaturas de operación de 200°C a 250°C.
- No ser tóxico.
- Ser grado médico.
- Ser translúcido.
- Registrado ante FDA.
- Aislar eléctricamente.
- Debe tener un espesor de 2mm.

La durabilidad depende de las condiciones de operación como temperatura, presión y de las características de la manguera.

A 1.25kg/cm<sup>2</sup> de presión y temperatura ambiental debe tener una vida media de duración de 2 años, esterilizando 2 a 4 veces por semana, a presión atmosférica se debe incrementar un 20% su durabilidad, (15).

## V-5. UNIFORME DE AREA ASEPTICA.

El ser humano vive en un mundo de microorganismos estableciendo frecuentemente un comensalismo, la piel del hombre es el principal contacto con su medio ambiente, billones de microorganismos viven en nuestra piel, boca, tracto intestinal, etc. un número considerable de microorganismos son ingeridos al comer, beber, inhalar aire, así como fibras y polvo; sin embargo, el organismo los mantiene retenidos debido a las barreras biológicas naturales del aparato respiratorio, digestivo y de la propia piel. La saliva contiene normalmente millones de microorganismos por mililitro, por lo que es una fuente de contaminación muy importante que se debe controlar. La piel cabelluda contiene una vasta flora incluyendo levaduras y hongos.

En forma involuntaria el factor humano se convierte en una fuente de contaminación dentro de un área aséptica para evitar esto, se establece el uso de uniformes especiales cuya principal finalidad es aislar completamente al operador dentro del área aséptica, (16).

### V-5.1. UNIFORME ESPECIAL PARA AREA ASEPTICA.

El uniforme debe estar integrado por los siguientes elementos:

Overol: Amplio, para permitir el libre movimiento, ajustado en puños y tobillos, con broches ajustables para mantener guantes y botas encima del overol, cierre

de contacto para evitar que se atore y que se oxide, cuello amplio para permitir la introducción del capuchón.

Capuchón: Largo para que cubra los hombros y con cintas para ajustar a los ojos, ojal que permite perfecta visibilidad.

Botas: Doble capa de suela en lana plana, cintas para ajustar a la pierna y no permitir la salida del overol.

Cubre bocas: Plisado para permitir el ajuste a la cara, cintas para su colocación.

#### V.5.2. MATERIAL DE FABRICACION.

Debe estar fabricado de algodón de fibra larga, con tejido cerrado especial para que no suelte pelusa y no permita el paso de descamación o de partículas, fibra natural que no debe encerrar a la persona dándole una sensación de frescura, no debe crear energía estática.

## V.6. SANITIZACION DEL AREA ASEPTICA.

A continuación se anotan algunas definiciones importantes:

**Bactericida:** Agente que destruye patógenos y otras bacterias.

**Bacteriostático:** Agente que previene el crecimiento de patógenos y otras bacterias.

**Fungicida:** Agente que destruye hongos patógenos y otros no patógenos.

**Fungistático:** Agente que previene el crecimiento de hongos patógenos.

**Sanitizante:** Agente que reduce la contaminación microbiana sobre superficies inanimadas.

**Esporicida:** Agente que destruye esporas de bacterias.

**Esterilizante:** Agente que destruye o elimina todas las formas de vida microbiana.

Hasta hace poco tiempo, era usual llevar a cabo la sanitización del área aseptica utilizando una solución de formaldehído, pero ha caído en desuso por su alta toxicidad, actualmente, se utilizan otros agentes menos tóxicos y de gran capacidad para eliminar todos los tipos de microorganismos, la adecuada selección de un sanitizante es muy importante para lograr una buena limpieza de las áreas.

La adecuada realización de los procedimientos de limpieza y sanitización, revisten una gran importancia en las buenas prácticas de manufactura.

Se estima que un elevado porcentaje de éxito de un

proceso de sanitización esta basado en una limpieza adecuada del área.

El personal encargado de realizar este tipo de operaciones es también un elemento de mucha importancia para obtener buenos resultados.

Es recomendable que éstas operaciones sean realizadas por personal debidamente capacitado, entrenado y responsable, por lo cual es de caracter primordial que el personal tenga conocimiento pleno de la importancia de su buena realización y de la manera adecuada de hacerlo, para ello debe existir un procedimiento escrito.

Para elegir un agente sanitizante se se deben considerar las propiedades de un agente sanitizante ideal.

Los bacteriologos sugieren que el sanitizante ideal reuna las siguientes características:

- a) Matar un amplio rango de microorganismos.
- b) No tóxico para humanos.
- c) No corrosivo, no manche el equipo.
- d) Poseer acción detergente.
- e) Buena estabilidad.
- f) Acción rápida.
- g) No debe ser inactivado por material orgánico.
- h) Económico.

Una consideración general para la selección de un agente puede ser por las características de las superficies del



aréa a ser tratadas, por ejemplo: El tipo de terminado;poroso, liso, áspero, rugoso, etc.

Para superficies porosas, la adición de un surfactante puede ser considerado para ayudar a la penetración.

El método de aplicación es otro importante paso en la evaluación por ejemplo: rociado, estropajo o sumergiendo, etc.

Las condiciones de máxima efectividad pueden diferir entre sanitizantes químicos, pero factores importantes incluyen

- a) pH
- b) Temperatura.
- c) Humedad.
- d) La naturaleza de el diluyente usado.
- e) Concentración.
- f) Presencia de material orgánico.
- g) Tiempo de contacto.

Las soluciones Ácidas generalmente exhiben un más rápido poder de muerte que las neutrales o soluciones alcalinas.

En general, la actividad del sanitizante se incrementa con el aumento de temperatura, donde el efecto en microbios es semejante a una reacción química,(17).

Es prudente considerar 2 o más agentes, la rotación tedricamente, tiende a impedir el desarrollo de un ambiente común, aislamiento o adaptación de microorganismos.

La rotación se debe llevar acabo en un tiempo base, se puede emplear, semanal, mensual, etc.

La última prueba de eficacia de un sanitizante es

la demostración de su efectividad en aplicación.

Para realizar el procedimiento de limpieza y sanitización del área aséptica, debemos tomar en cuenta los siguientes puntos :

- a) Diariamente, remover toda la basura hacia fuera del área aséptica, y colocar una bolsa de plástico debidamente sanitizada con alcohol al 70 % y expuesta a la luz ultravioleta durante 45 minutos, en cada recipiente de basura.
- b) Diariamente, limpiar fregaderos, espejos, secadores de aire y contenedor de uniformes, en los vestidores.
- c) Diariamente, usar un balde sanitizado y una esponja que no genere partículas, limpiar todos los pisos con agua filtrada estéril y desechar lo sobrante enjuagar la esponja y balde con agua caliente entonces usar una solución sanitizante, para limpiar todos los pisos.
- d) Con la frecuencia que se requiera, limpiar todas las paredes con la solución sanitizante en turno, usando una esponja.
- e) Limpiar todas las ventanas y sus bordes con la solución sanitizante en turno, con la frecuencia que requiera.
- f) Después de cada limpieza y sanitización deberá rociarse el área con el sanitizante en turno deján-

dolo expuesto durante 24 horas mínimo antes de iniciar el proceso de producción.

- g) Llevar un registro por escrito de las fechas en que haya sido limpiada y sanitizada el área así como de el sanitizante utilizado.
- h) Por lo menos, anualmente, validar el programa de sanitización, idem obcit página 30.

## V.7. EQUIPOS

### V.7.1. VALIDACION DEL PROCESO DE ESTERILIZACION EN AUTOCLAVE (CALOR HUMEDO).

La validación comprende inicialmente la elaboración de un protocolo, el cual deberá ser aprobado por el comité de validaciones, integrado por el personal de la empresa, de las áreas de producción, ingeniería de planta, garantía de calidad y dirección de operaciones, éste comprende los siguientes puntos:

- I. Introducción.
- II. Materiales, reactivos e instrumentos.
- III. Identificación del equipo y la carga.
- IV. Criterios de aceptación.
- V. Procedimientos.
- VI. Resultados.
- VII. Conclusiones.

Los estudios que se llevan a cabo son los siguientes:

- a) Calibración de instrumentos.

Esta fase requiere la calibración de los termopares, dicha calibración debe ser efectuada con estándares certificados por dirección de pesas y medidas gubernamental comercial, los datos de calibración deben reflejar la precisión y exactitud del instrumental en cuestión, (18).

El instrumento de medición, así como los termopares deberán ser calibrados contra termómetros de resistencia de platino RTD calibrados con trazabilidad N.B.S. y ningún

termopar deberá mostrar una desviación mayor de  $\pm 0.5$  °C. Con los termopares conectados, sumergir el extremo sensor del termopar unidos lo más cercanamente posible al termómetro certificado, en un baño de hielo a temperatura de 0°C, cambiar los termopares a un baño de temperatura constante a 100 °C y registrar la temperatura, esto para verificar la linealidad del microprocesador.

b) Calificación del equipo.

Se lleva a cabo la calificación del equipo e instalación previamente a la validación documentando la operación, tomar los datos directamente de la unidad a validar.

Se efectúa la calificación mediante la obtención de la información que documente la certeza de una operación consistente, confiable y reproducible, como:

- Verificación del sello adecuado de la puerta.
- Verificación de la presión de alimentación de vapor, de la presión de la chaqueta y de la cámara, todas ellas o las que correspondan.
- Velocidad de enfriamiento y calentamiento de la cámara.
- Presión de operación de la válvula de seguridad.
- Distribución de calor en la cámara vacía.

c) Prueba de cámara vacía.

La prueba inicial se lleva a cabo sobre la cámara vacía, para medir distribución de temperatura, el perfil de temperatura sirve para localizar áreas calientes o frías en el autoclave

trazando las temperaturas de varios puntos en las cámara. El perfil de temperatura es obtenido colocando por lo menos 10 termopares distribuidos en el autoclave sobre una ruta establecida para determinar perfiles de calor.

El perfil de temperatura en pruebas de cámara vacía es aceptable, si tres series o ciclos consecutivos son reproducibles,(19).

d) Prueba de cámara cargada.

Así como en las pruebas de cámara vacía, estudios de validación durante pruebas de cámara cargada parcial o total, serán incluidas pruebas de distribución de calor los termopares usados en estudios de distribución de calor, en pruebas de cámara cargada, serán situados en algunas de las localizaciones usadas para prueba de cámara vacía.

Los estudios de distribución de calor, serán llevados acabo para determinar el efecto de la carga, sobre la distribución de temperaturas en la cámara.

Los estudios de penetración de calor serán monitoreados con la cámara cargada.

La información de penetración de calor, es critica en una cámara cargada parcial o totalmente, la proporción de penetración de calor, dependerá del tipo de material en la carga, como es colocada y la uniformidad de distribución de temperatura.

Los datos de penetración de calor serán obtenidos colocando los termómetros dentro de los contenedores o pro-

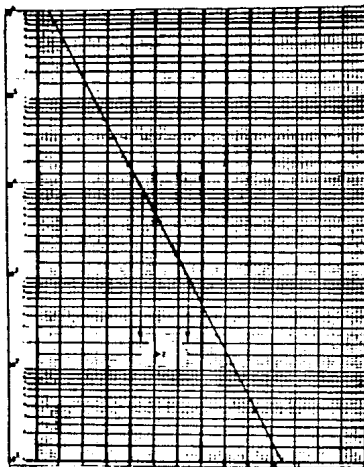
ducto, así cada tipo, tamaño y configuración de la carga de los materiales, serán aprobadas para estudios de penetración de calor, como resultado, las áreas calientes y frías pueden variar para cada tipo de carga en el autoclave, es recomendable que la localización de termopares para estudios de penetración de calor, sean cambiados después de cada corrida para obtener un panorama global del estudio de penetración de calor en el esterilizador, el perfil de temperaturas es aceptable, si tres ciclos consecutivos son reproducibles.

Un término importante en la expresión de la muerte cinética de los microorganismos en la esterilización por calor es el valor "D". El valor D es el tiempo requerido para que la población microbiana decrezca un 90% o una unidad logarítmica, idem *ibcit* página 33.

El valor "D" puede ser estimado registrándose en un esquema como se muestra en la gráfica número 5.

Varios términos usados en la determinación de la velocidad de muerte cinética de microorganismos son: El valor  $F_0$ , lente/temperatura entre las condiciones de prueba y una temperatura de referencia (121 °C), utilizando un valor específico de Z. El valor Z significa el número de grados (°C o °F) requeridos para que el valor "D" sea reducido en un 90 % o una unidad logarítmica, éste efecto se muestra en la gráfica 6.

No.  
m  
i  
c  
r  
o  
o  
r  
g  
a  
n  
i  
s  
m  
o  
s



tiempo (minutos)

Gráfica 5. Representación semilogarítmica de la velocidad de muerte de los microorganismos.

Evaluación de la prueba de penetración de calor:

- a) Observar las lecturas de temperatura registradas para cada uno de los termopares y localizar el punto más frío.
- b) Calcular el valor de  $F_0$  para cada una de las lecturas registradas en el punto más frío para efectuar el cálculo se utiliza la siguiente fór-



mular:

$$F_0 = t \times 10^{\frac{T_1 - T_2}{Z}}$$

Donde :

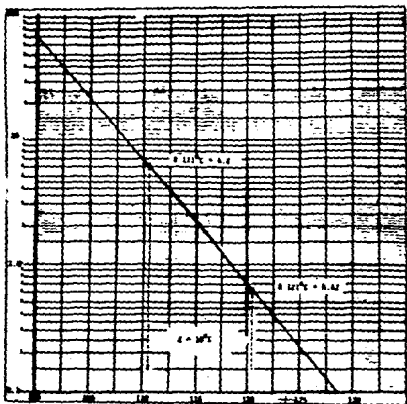
t = 1 minuto (intervalo de tiempo entre una temperatura y otra).

T<sub>2</sub> = Temperatura de prueba al tiempo t (lectura).

T<sub>1</sub> = Temperatura de referencia (121 °C).

Z = 10 °C.

V  
a  
l  
o  
r  
e  
s  
"D"  
(Minutos)



Temperatura °C

Gráfica 6. Efecto de la temperatura sobre los valores " D ".

- c) Efectuar la sumatoria de todos los valores de  $F_0$  calculado.
- d) Comparar el valor obtenido de la sumatoria con el criterio de esterilización, que es de 15 minutos de exposición en un vapor saturado a una temperatura de 121°C.
- e) El ciclo de esterilización por calor húmedo se considera adecuado, si el valor obtenido es igual o mayor al del criterio de esterilización.

Frecuentemente, se utiliza como indicador biológico junto con la carga, una muestra de esporas termorresistentes; como son las de *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium sporogenes*, (20).

#### V.7.2. REALIZACION Y COMPROBACION DE LA ESTERILIZACION DEL TANQUE CONTENEDOR.

La esterilización es un procedimiento encaminado a la destrucción o a la exclusión de todos los microbios vivos y sus esporas, cuando un objeto no contiene microbios vivos, se dice que está estéril, pero la esterilidad sólo se puede mantener mientras se tengan las condiciones necesarias para evitar el transportar microorganismos y depositarlos sobre el objeto a esterilizar.

La esterilización por vapor de agua a presión, consiste en aplicar vapor de agua bajo presión, por períodos variables, según la naturaleza de los objetos a esterilizar. Con este procedimiento la combinación de humedad y calor destruye en breve tiempo tanto las esporas como las formas vegetativas de las bacterias. Se emplea la presión de 15 libras/pul<sup>2</sup> (1.055Kg./cm<sup>2</sup>) o sea poco más de una atmósfera sobre la presión atmosférica, que da una temperatura de 121.5 °C, por espacio de 20 minutos y la presión de 20 libras (1.406Kg./cm<sup>2</sup>) durante 15 minutos lo que corresponde a 126.5 °C. También se emplea la presión de 10 libras (703g./cm<sup>2</sup>), 115 °C por 30 minutos, para la esterilización de materiales que no toleran mayores temperaturas. (21).

##### V.7.2.1. CARACTERISTICAS DEL VAPOR.

La calidad de vapor empleado en la esterilización es

#### V.7.2. REALIZACION Y COMPROBACION DE LA ESTERILIZACION DEL TANQUE CONTENEDOR.

La esterilización es un procedimiento encaminado a la destrucción o a la exclusión de todos los microbios vivos y sus esporas, cuando un objeto no contiene microbios vivos, se dice que está estéril, pero la esterilidad sólo se puede mantener mientras se tengan las condiciones necesarias para evitar el transportar microorganismos y depositarlos sobre el objeto a esterilizar.

La esterilización por vapor de agua a presión, consiste en aplicar vapor de agua bajo presión, por períodos variables, según la naturaleza de los objetos a esterilizar. Con este procedimiento la combinación de humedad y calor destruye en breve tiempo tanto las esporas como las formas vegetativas de las bacterias. Se emplea la presión de 15 libras/pul<sup>2</sup> (1.055Kg./cm<sup>2</sup>) o sea poco más de una atmósfera sobre la presión atmosférica, que da una temperatura de 121.5 °C, por espacio de 20 minutos y la presión de 20 libras (1.406Kg./cm<sup>2</sup>) durante 15 minutos lo que corresponde a 126.5 °C. También se emplea la presión de 10 libras (703g./cm<sup>2</sup>), 115 °C por 30 minutos, para la esterilización de materiales que no toleran mayores temperaturas. (21).

##### V.7.2.1. CARACTERISTICAS DEL VAPOR.

La calidad de vapor empleado en la esterilización es

un factor definitivo tanto para asegurar la efectividad del proceso como para evitar daños en sus sistemas de generación y distribución. El tratamiento que se le hace al agua potable utilizada para generar vapor consiste, en eliminar todas las sales de calcio y magnesio, por ello, antes de entrar a la caldera es pasada por un sistema de suavizado que las elimina, para asegurar que el agua esta libre de sales, se toman 5ml y se le adiciona un reactivo que las precipita, en caso de que se presente un precipitado el agua contiene sales y no se puede utilizar para generar vapor, si la prueba no origina un precipitado el agua no contiene sales y se puede emplear para generar vapor.

#### V.7.2.2. GENERACION Y DISTRIBUCION DE VAPOR.

El agua potable que sale del sistema de suavizado entra a la caldera donde es evaporada y sale a una presión de 7Kg/cm<sup>2</sup>, la distribución se realiza en tubos galvanizados aislados con fibra de vidrio. El vapor que es utilizado para esterilizar el tanque contenedor debe pasar por un filtro de acero sinterizado, el cual elimina partículas entre 1 y 25 micrones, esta filtración es crítica dado que elimina contaminantes sólidos de tipo inorgánico que se generan durante el flujo de vapor a través de la tubería por choques múltiples. El filtro de vapor debe tener características que aseguren su función dado que es un elemento crítico en la pureza del vapor.

El filtro debe cumplir las siguientes características:

Medio filtrante: acero inoxidable sinterizado.

Area filtrante: 70 cm<sup>2</sup>.

Tamaño de poro: 1 micrón.

Presión y temperatura de trabajo: 29 bares, -20'a+210°C

El filtro de acero inoxidable debe resistir los ataques químicos y elevadas presiones, permitirá eliminar partículas y óxidos del vapor, evitando que durante el proceso de producción, se originen alteraciones químicas o biológicas en los productos, así mismo evita la acumulación de partículas y óxido en las tuberías de conducción de vapor, permitiendo un buen funcionamiento y mayor duración de las tuberías.

### V.7.3. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE PROCESO DE LA LLENADORA DE AMPOLLETAS.

Un estudio de CP es un metodo estadistico analitico empleado para determinar la capacidad y predecir la consistencia de produccion de una maquina, esto permite asegurar que se satisfacen las especificaciones establecidas. El estudio de CP debera realizarse cuando las condiciones de produccion sean estables y bajo las condiciones normales de produccion. Se requiere de un tamaño minimo de muestra de 30 unidades. en muchos casos se recomienda un tamaño de muestra mayor para aumentar la confianza del resultado del analisis. La CP debe volverse a determinar cuando ocurran cambios ya sean debido al producto, material, herramienta e incluso debido a cambios ambientales.

La obtención de los datos representativos (muestra) es definitiva en el cálculo de CP, el criterio más empleado es de 5 elementos por subgrupo, éste criterio toma como base, el que la distribución se acerque a la normal aunque el universo no presente una curva normal.

Mientras menor sea el número de subgrupos tomados más pronto se tendrá una idea para actuar, pero menor será la seguridad de que ésta base sea confiable. Es conveniente tener al menos 25 subgrupos, la experiencia indica que las primeras muestras pueden no ser representativas de lo que se mide posteriormente dado que la sola acción de tomar conciencia de qué se está midiendo, puede influir en la variación de los datos, (22).

### V-7-3.1. APLICACIONES DE CP.

1. Permite diferenciar las variaciones atribuibles al azar o fortuitas y las variaciones atribuibles a causas determinadas que suponen variaciones anormales, de ésta forma se visualiza el comportamiento del proceso para poder mejorarlo continuamente.
2. Permite determinar las posibilidades de un determinado equipo.
3. Indican la necesidad de reparación o sustitución de equipo.
4. Son criterio objetivo e impersonal para decidir la conveniencia de adquisición de un determinado equipo.
5. Evaluación de la eficiencia del mantenimiento.
6. Evaluación periódica de la calidad del proceso para establecer los cambios necesarios, dado que proporciona un criterio para la toma de decisiones reales durante la producción acerca de cuando investigar causas de variación y tomar acción para corregirlas y cuando dejar sólo el proceso.
7. Determinación de nuevas especificaciones en proceso y producto.
8. Evaluación periódica de proveedores o contratistas.
9. Obtener información para establecer o modificar los procedimientos de inspección, idem obcit página 43.



## VI. CRITERIOS DE ACEPTACION

- VI.1. La carga microbiana del agua debe estar dentro de especificaciones para agua de uso farmacéutico, la cual es de 500 UFC/100 ml., idem obcit página 14.
- VI.2. El ciclo de esterilización debe cumplir las siguientes condiciones:
- VI.2.1. Tiempo de esterilización 15 minutos.
  - VI.2.2. Temperatura de esterilización 121-1°C
- VI.3. El aire comprimido filtrado debe ser estéril y no contener partículas ni microorganismos, idem obcit página 10.
- VI.4. El área aseptica cumplira las siguientes condiciones:
- VI.4.1. Temperatura: 18°C a 25°C.
  - VI.4.2. Humedad relativa: 40% a 60%
  - VI.4.3. Area clase 100: No más de 100 partículas de 0.5 u/pie 3 de aire.
  - VI.4.4. Area clase 1000: No más de 1000 partículas de 0.5 u/pie 3 de aire.
  - VI.4.5. Area clase 10000: No más de 10000 partículas de 0.5u/pie 3 de aire.
  - VI.4.6. Velocidad de aire: 70 a 110 pies 3/min.  
21.6 a 33.9 m/min.
  - VI.4.7. Patrón de flujo: Laminar bajo la campana de flujo laminar.

turbulento en áreas fuera  
del módulo de flujo laminar.

VI.4-8. Biocarga: módulo de flujo laminar  $1 \times 10^{-6}$  UFC.

Áreas asépticas  $1 \times 10^{-4}$  UFC.

Vestidores y exclusas:  $1 \times 10^{-3}$  UFC.

VI.5. Llenado aséptico: Llenar mínimo 3000 ampollitas,  
el porcentaje máximo de contaminación es de 0.1 %  
del total de ampollitas llenas, ídem ídem página 3. La  
fórmula siguiente permite calcular el porcentaje de  
contaminación:

$$C = \frac{G}{N - D} \times 100$$

Donde:

C = Es la proporción en porcentaje de contaminación.

N = Es el número total de envases llenados en la  
prueba.

D = Es el número de envases maltratados.

G = Es el número de envases no maltratados que presen-  
tan crecimiento.

## VII. MATERIALES

### VII.1. MATERIAL.

- Porta asas.
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml.
- Pinzas de cirujano dentista.
- 4000 ampolletas de vidrio de 5 ml.
- Garrafón de 25 ml.
- Aditamentos para conexión contenedor-máquina llenadora.
- Piseta con sanitizante en turno.
- Mangueras y agujas estériles.
- 25 cajas Petri.
- 28 marcos de papel.
- Pipeta volumétrica de 10 ml.
- Masking tape.
- Tubos de ensayo con tapón de baquelita.
- Hisopos esterilizados.
- Pipeta volumétrica de 1 ml.

### VII.2. EQUIPO.

- Espectrofotómetro.  
Marca: Beckman  
Serie: DU 68
- Contador de colonias.

Marca:Darkfiel Q.

Modelo:3325

-Incubadora.

Marca:J. M. ORTIZ

-Baño de agua.

Marca:Elecsa

-Autoclave.

Marca:William Meyer

-Máquina llenadora de

ampolletas.

Marca:Marzocchi

-Uniformes y aditamen-  
tos para área estéril.

-Cronómetro.

Marca:Sargent W.

Serie:19783-A

### VII.3. REACTIVOS.

-Caldo de cultivo de soya de tripticaseina.

Marca:Bioxon

-Cepas de B.subtillis.

-Cepas de C.albicans.

-Agua esterilizada.

-Agar selectivo.

Fórmula de CINVESTAV.

-Agar casoy.

Marca:Merck

-Soluciódn fisiológica de NaCl 0.85 % .

## VIII. METODOS

### VIII.1. MONITOREO MICROBIOLOGICO DEL AREA ASEPTICA.

El monitoreo microbiológico del área se debe realizar distribuyendo cajas de agar casoy y medio selectivo, abarcando una caja por 10 m<sup>2</sup> o mínimo una caja por cubiculo, un ejemplo de ésta distribución se muestra en el diagrama 1. La exposición dura 30 minutos despues de este tiempo las cajas se incuban durante 72 horas para detectar bacterias y 120 horas a temperatura ambiente para detectar hongos. Los monitoreos se realizan con personal y sin personal.

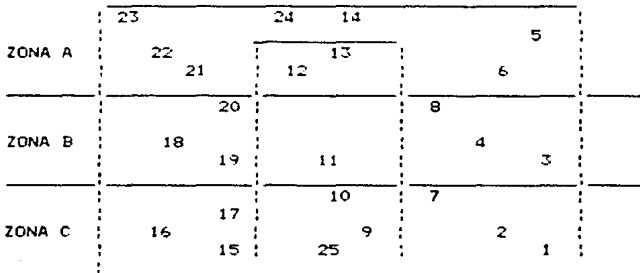


Diagrama 1. Lugares de exposición de cajas de agar casoy (nones) agar selectivo (pares).

## VIII-2. SEGURIDAD FUNCIONAL DEL SISTEMA DE FILTRACION DE AIRE COMPRIMIDO.

Después de instalar el sistema de filtración se debe asegurar y comprobar que su funcionamiento coincide con el establecido en su diseño dando en consecuencia,aire comprimido libre de contaminación objetivo primordial del sistema.

El reto al sistema se basa en la prueba dirigida a detectar contaminación por microorganismos y consta de los siguientes pasos:

1. Encender 2 mecheros Bunsen a 15 cm equidistantes de la salida de aire comprimido.
2. Permitir la salida de aire comprimido durante 10 minutos.
3. Cerca de la salida de aire comprimido abrir una caja de Petri con agar casoy de tal forma que el aire se impacte en la parte central de la caja, repetir esto en 3 ocasiones.
4. Incubar las cajas con un blanco a una temperatura de 35°C a 37°C durante 72 horas después de éste tiempo incubar por 120 horas más a temperatura ambiente,la primera incubación permite determinar bacterias y la segunda hongos.

## VIII.3. REALIZACION Y COMPROBACION DE LA ESTERILIZACION DEL TANQUE CONTENEDOR.

Se distribuyen los bioindicadores en el interior del

tanque, ver figura 6. Se conecta la entrada de vapor y cuando la presión llega a 2Kg/cm<sup>2</sup> y la temperatura de 127 a 128°C se permite la salida de vapor por las válvulas abriéndolas media vuelta para que se esterilicen. El tiempo de esterilización es de 4 horas con una purga de condensado a los 10 minutos sin que disminuya la presión ni la temperatura. La esterilización del filtro de aire se realiza en línea por lo que se coloca 20 minutos antes de que terminen las 4 horas del proceso de esterilización, esto disminuye el gasto del filtro incrementando su conservación.

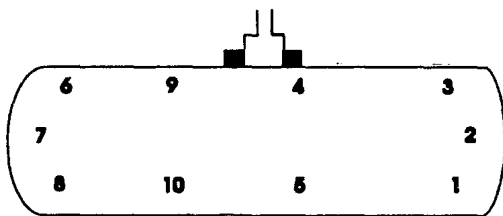


Figura 6. Distribución de bioindicadores ( X \* ) en el tanque.



VIII.4. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EL CP DE LA LLENADORA DE AMPOLLETAS.

- a) Preparación de una suspensión de almidón con una transmitancia de 98 %.

En un garrafón de 20 L. adicionar 15 L. de agua y 0.3 gr de almidón.

- b) Ajustar la máquina anotando lo siguiente:

- |             |                           |
|-------------|---------------------------|
| - Fecha.    | - Cambios realizados.     |
| - Hora.     | - Condiciones de humedad, |
| - Operador. | temperatura y presión.    |

Todo esto permitirá detectar causas especiales de variación en los datos.

- c) Iniciar el llenado con ampolletas de 5 ml. calibre 4, la suspensión de almidón debe tener agitación constante durante el llenado realizar el muestreo de la siguiente forma: tomar 20 ampolletas cada 12 minutos, durante 60 minutos para formar 5 subgrupos y una muestra total de 100 ampolletas, los datos se registran en la gráfica de control.
- d) Establecer el volumen de 5.1 ml. por ampolletas como variable de control y calcular los promedios y rangos por subgrupo.
- e) Realizar las gráficas de  $\bar{X}$  y  $\bar{R}$  para determinar el comportamiento del proceso, si el proceso tiene un comportamiento normal, determinar la capacidad de proceso de la llenadora.
- f) Determinación de CP. de la llenadora de ampolletas, realizan-

do el siguiente tratamiento estadístico:

1. Calcular  $\bar{X}$  de cada subgrupo.
2. Calcular R de cada subgrupo.
3. Calcular  $\bar{X}$  de  $\bar{X}$  de toda la muestra.
4. Calcular  $\bar{R}$  de R de toda la muestra.
5. Calcular la desviación estándar de proceso con la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{\bar{R}}{d_2}$$

$\bar{R}$  = Media de los rangos de subgrupos.

$d_2$  = Constante en base a 3 desviaciones estándar.

6. Calcular el CP, utilizando la siguiente fórmula.

$$CP = \frac{LSE - LIE}{6 \delta}$$

LSE = Limite superior de especificación.

LIE = Limite inferior de especificación.

$\delta$  = Desviación estándar del proceso.

**ESPECIFICACION:** Se establece en un rango de variación que contenga la mínima dosificación.

LSE = 5.2 ml.      LIE = 5.0 ml.

g) Evaluar la capacidad de proceso con base a la siguiente tabla:

Valor CP.	Tipo de proceso	Observaciones
> 1.2	Bueno.	Sólo requiere la supervisión normal
1.0 - 1.2	Regular.	Requiere una supervisión estrecha
< 1.0	Malo.	El proceso no es adecuado.

h) Con base a las cartas de control y el CP dar un informe para optimizar programas de mantenimiento, manejo y conservación de la llenadora de ampollitas.

#### VIII.5. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

a) Determinación de pH.

Esta se efectúa a 25°C usando potenciómetro.

b) Prueba de esterilidad del medio de cultivo.

(control negativo)

De los 25 lts. preparados de caldo de soya-tripticaseína tomar 1 lt. (equivalente al 4%), colocarlo a incubación a 35°C - 37°C de 72 a 120 horas.

El medio de prueba es satisfactorio si no aparece crecimiento dentro de los 2 primeros días de incubación,(24).

c) Prueba de promoción de crecimiento.

(Control positivo)

Los microorganismos empleados en las pruebas de promoción de crecimiento deben de formar parte de la colección de cada laboratorio y estar identificadas con la clave del cepario de procedencia. La selección de ellos depende del tipo de medio de cultivo por estudiar.

Los cultivos empleados deben ser recientes: de 18 a 24 horas para bacterias; de 24 a 48 horas para hongos levaduriformes y de 7 a 28 días para hongos filamentosos.

Cosechar cada microorganismo de prueba en solución reguladora de fosfatos pH = 7.2

Preparar una suspensión con el regulador de fosfatos de tal forma que a 580 nm obtenga una lectura espectrofotométrica entre 50-80% de transmitancia.

Apartir de la suspensión obtenida en el inciso anterior preparar diluciones decimales y mediante la técnica de vaciado en placa, seleccionar aquellas diluciones en las que se encuentre aproximadamente 100 UFC/ml. para este recuento utilizar agar para métodos estándar.

De los 25 litros preparados, tomar un litro del medio de cultivo y dividirlo en 4 partes iguales, a dos partes adicionar un mililitro de una suspensión que contenga no más de 100 esporas/ml. de B. subtilis, de los contenedores llenados e inoculados, uno se incuba a una temperatura de 20 - 25°C durante 72 horas y el otro a una temperatura de 35 - 37°C durante 120 hrs.

Se repite la operación con los otros contenedores llenados restantes inoculando con un mililitro de una suspensión que contiene no más de 100 esporas/ml. de C. albicans. Un recipiente se incuba a una temperatura de 20 - 25°C durante 72 horas y el otro a una temperatura de 35 - 37°C durante 120 hrs.

Simultáneamente sembrar por duplicado un mililitro de la suspensión para la cuenta en placa, con el fin de confirmar la viabilidad.

Si los tubos o recipientes que contienen el medio de cultivo inoculado presentan turbiedad y la cuenta en placas es la esperada, la prueba de promoción de crecimiento y el lote del medio de cultivo se aprueba para su uso, idem *obcit* página 56.

#### VIII.6. MUESTREO DE COMPONENTES PRIMARIOS (AMPOLLETAS).

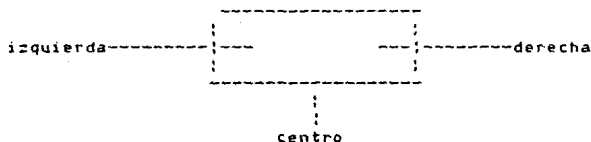
a) A 6 matraces Erlenmeyer de 500 ml. adicionar 250 ml. de caldo de soya-tripticaseina uno se considera como blanco y los restantes se utilizarán para incubar la muestra de contenedores primarios.

b) Someter los matraces a esterilización por autoclave durante 15 minutos a 121°C como mínimo.

c) De todo el lote de contenedores primarios tomar una muestra de 25 de la siguiente forma:

I. Escoger al azar 9 charolas y numerarlas apartir de uno.

II. De las primeras 8 charolas tomar 3 contenedores primarios considerando los puntos siguientes:



charola de acero inoxidable

III. De la charola 9 extraer un contenedor primario de cualquier punto.

d) La muestra de 25 contenedores primarios se distribuyen en los matraces preparados previamente, dejando uno como blanco, se incuban a una temperatura de 35 - 37°C durante 7 días.

e) Registrar si existe contaminación en los matraces.

## VIII.7. LLENADO ASEPTICO.

### VIII.7.1. AJUSTE DE MAQUINA.

La máquina debe ajustarse antes de iniciar la validación, los parámetros que deben controlarse son.

1. Volumen de llenado : Deberá chequearse durante el llenado.
2. Velocidad de la máquina : Checarla durante el llenado.
3. Ajuste de agujas : Deberán estar concéntricas y a una altura de 2.5 cm. con respecto a la base de la ampollita, para evitar formación de espuma y turbulencias.
4. Flama: Regular la mezcla de gases, estableciendo la salida de gas butano a una presión de 1.0 Kg/cm<sup>2</sup> y la de oxígeno a una presión de 1.0 Kg/cm<sup>2</sup>.
5. Verificar tamaño de ampollitas: Las ampollitas de 5 ml. deben estar dentro de las especificaciones que señala control de calidad.
6. Verificar tamaño y calibre de agujas para suspensión.

### VIII.7.2. PROCEDIMIENTO.

1. De los 25 litros de caldo de soya de tripticaseina tomar 20 y colocarlos dentro de un garrafón.
2. Los 20 litros de medio de cultivo, se esterilizan en autoclave, ciclo previamente validado, durante 15 minutos a 121 °C y 15 lb/cm<sup>2</sup>.
3. El medio de cultivo se incuba durante 7 días a una tem-

peratura de 35°C - 37°C para verificar posible riesgo de contaminación.

4. Dentro de la campana de flujo laminar colocar las mangueras y agujas esterilizadas a la llenadora y drenar con agua esterilizada todos los conductos del sistema de dosificación durante 10 minutos.
5. Dentro del módulo de flujo laminar, colocar el tapón oradado al garrafón que contiene el medio de cultivo, introducir la varilla de vidrio y en su punta externa unir la manguera fijándola perfectamente con cinta adhesiva, la otra punta de la manguera se une a la toma de la llenadora cuidando que no quede chupada, rota o floja.
6. Llenar las ampollitas, operando el funcionamiento de los sistemas de la llenadora en el siguiente orden:
  - I. Sistema de alimentación de ampollitas.
  - II. Sistema de corte de ampollitas.
  - III. Sistema de dosificación de ampollitas.
  - IV. Sistema de sellado de ampollitas.
  - V. Sistema de recolección de ampollitas.Durante el llenado se verifica, el volumen de dosificación y la velocidad, paralelamente control de calidad realizará lo siguiente:
  - a) Muestreo de componentes primarios.
  - b) Monitoreo microbiológico del área.
  - c) Muestreo de superficies expuestas en áreas críticas.
7. Realizar la prueba de hermeticidad a todo el lote llenado.



8. Colocar en la incubadora los contenedores primarios a una temperatura de 35°C - 37°C durante 72 horas para evaluar crecimiento bacteriano.
9. Posteriormente se someten a una temperatura de 20°C - 25°C durante 120 horas más para evaluar el crecimiento de hongos.

#### VIII-8. MONITOREO MICROBIOLÓGICO DEL ÁREA ASEPTICA.

##### VIII-8.1. PROCEDIMIENTO.

1. Preparar 13 placas de agar selectivo y 12 placas de agar casoy, para abarcar toda el área aseptica, se expone una placa por cada 10m<sup>2</sup> de piso o un mínimo de una placa por cuarto, (25).
2. Etiquetar las cajas, con el número del lugar y colocarlas en las áreas como se muestra en el diagrama No.2.
3. De las 25 placas, 3 se distribuyen en zonas críticas del equipo de llenado otra se coloca donde haya un mayor flujo de personal y la última, donde el historial establecido para el área represente el peor caso.
4. Cada placa de prueba se expone durante 30 minutos en condiciones normales de operación, al recogerlas se registra el número de personas presentes en el cuarto.
5. Se incuban las placas durante 72 horas a una temperatura de 35 - 37°C para evaluar crecimiento bacteriano, posteriormente se someten a una temperatura de 20 - 25°C durante 120 horas más para evaluar el crecimiento de hongos.

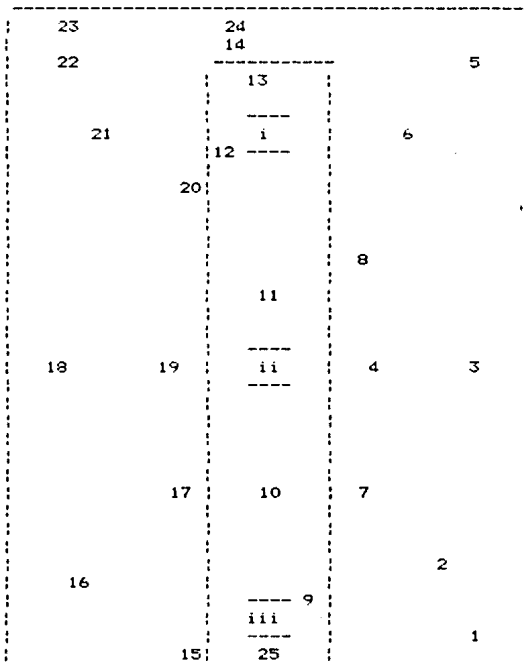
## VIII.9. MUESTREO DE SUPERFICIES EXPUESTAS.

### VIII.9.1. PROCEDIMIENTO.

1. Preparar 300 ml. de agar casoy en un matraz Erlenmeyer y en otro matraz, 250 ml. de solución fisiológica de NaCl.
2. A 12 tubos de ensaye adicionar, a cada uno, 10ml. de solución fisiológica y colocarles el tapón de baquelita, adicionar 30 hisopos en un tubo de ensaye, cerrarlo y esterilizarlos junto con el medio de cultivo y 12 cajas Petri, en autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos y 15lb./cm<sup>2</sup> de presión.
3. Etiquetar del 1 al 12 los tubos de ensaye y las cajas Petri.
4. Siguiendo el diagrama No. 3 y utilizando el marco cuadrado tomar las muestras de las superficies expuestas con los hisopos humedecidos en la solución fisiológica colocarlos en los tubos, que tengan el número del lugar muestreado.
5. De los tubos con la muestra, tomar 1 ml. y adicionarlo a las cajas Petri, agregar aproximadamente 20 ml. de agar fundido (50°C), en condiciones asepticas, homogenizar con un movimiento en ocho y dejar solidificar.
6. Colocar en la incubadora las placas a una temperatura de 35 - 37°C durante 72 horas, para evaluar crecimiento bacteriano.
7. Posteriormente, se someten a una temperatura de 20 - 25°C durante 120 horas más, para evaluar el crecimiento de hongos.

DIAGRAMA DEL AREA ASEPTICA No. 2

Distribución de placas para monitoreo microbiológico.



módulo de  
flujo  
laminar

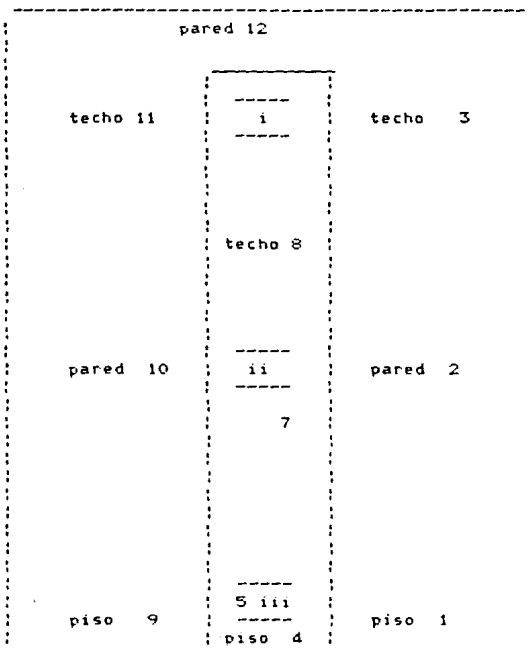
i,ii,iii, = Posición de las llenadoras.

Números nones:Placas con agar casoy.

Números pares:Placas con agar selectivo.

DIAGRAMA DEL AREA ASEPTICA No. 3

Muestreo de superficies expuestas.



módulo de  
flujo  
laminar

i,ii,iii, = Llenadoras de ampollitas.

Se muestrea lo siguiente:

Techo. Máquina llenadora iii (5).

Pared. Guantes del operador de

Piso. la llenadora (6).

## IX. RESULTADOS

IX.1. Los resultados de monitoreo microbiológico del área aséptica se integran en los siguientes cuadros:

EXPOSICION SIN PERSONAL NI MAQUINAS	
ZONA	UFC/MIN/CM2
A	0
B	$1.3 \times 10^{-4}$
C	$5.2 \times 10^{-5}$

Cuadro No.1

EXPOSICION SIN PERSONAL NI MAQUINAS	
ZONA	UFC/MIN/CM2
A	$1.26 \times 10^{-9}$
B	$7.66 \times 10^{-4}$
C	$7.31 \times 10^{-4}$

Cuadro No-2

Los resultados demuestran que se tiene un ambiente aséptico que garantiza una adecuada protección contra la contaminación microbiológica.

IX-2. Los resultados de la prueba de seguridad funcional del sistema de aire comprimido son los siguientes;

TEM. DE INCUBACION DE 35°C A 37°C	
CAJA	UFC
1	0
2	0
3	0
4 BLANCO	0

Cuadro No.3

TEMPERATURA DE INCUBACION AMBIENTAL	
CAJA	UFC
1	0
2	0
3	0
4 BLANCO	0

Cuadro No.4

Los resultados de la prueba permiten determinar que el funcionamiento del sistema de filtración de aire comprimido cumple con lo establecido en su diseño por lo tanto el aire comprimido utilizado en la agitación de la suspensión es estéril por lo que es aplicable sin ningún riesgo de contaminación.

**IX.3. Los resultados de la comprobación de la esterilización del tanque contenedor.**

Después de esterilizar el tanque contenedor, los bioindicadores son retirados del tanque contenedor, se presiona la parte media de cada uno, para romper la burbuja de vidrio y dejar en contacto las bacterias con el medio de cultivo, los resultados se reportan en el cuadro número 5.

Posición	Color del bioindicador
1	Violeta
2	Violeta
3	Violeta
4	Violeta
5	Violeta
6	Violeta
7	Violeta
8	Violeta
9	Violeta
10	Violeta
Blanco	Amarillo
Condiciones de esterilización P=2Kg/cm <sup>2</sup> T=127-128°C Tiempo=24Hs.	Incubación Temp.=55°C Tiempo=96Hs.

**Cuadro No.5 Control de bioindicadores después de la esterilización e incubación.**

IX.4. Los resultados de la capacidad de proceso de la  
llenadora de ampolletas.

Todas las lecturas estan dadas en mililitros.

Límite superior de especificaciones: 5.2 ml.

Límite inferior de especificaciones: 5.0 ml.

$d_2 = 3.735$  ( valor establecido para el tamaño de  
muestra ).

$s$  = Desviación estandar.

IX.4.1. Lecturas obtenidas.

GRUPO	LEC. 1	LEC. 2	LEC. 3	LEC. 4	LEC. 5
1	5	5	5	4.9	4.9
2	5	4.9	5	5	5
3	5	4.9	5	5	4.9
4	5	4.9	5	5	4.9
5	5	4.9	4.9	5	5
6	5	5	5	5	5
7	4.9	5	5	5	5
8	5	5	5	5	5
9	4.9	5	5	5	5
10	5	5	4.9	5	5
11	5	5	5	5	5
12	5	5.1	5	4.9	5
13	5.1	5	4.9	5	5
14	5	5	4.9	5	4.9
15	5	5	5	5	5
16	5	5	5	5	5
17	5	5	5.1	5	5
18	5	5	5	5	4.9
19	4.9	5	5	5	5.1
20	5	5	5	4.9	5
21	5	5	5	5	5
22	5	4.9	5	5	5
23	5	5	4.9	5	5
24	5	5	5	5	5



IX.4.2. Operaciones.

$$\hat{\sigma} = \frac{\bar{R}}{d_2}$$

$$\hat{\sigma} = \frac{0.08333}{3.735}$$

$$\hat{\sigma} = 0.02231$$

$$CP = \frac{LSE - LIE}{6\hat{\sigma}}$$

$$CP = \frac{5.2 - 5.0}{6(0.02231)}$$

$$CP = 1.49$$

Dado que el valor de CP es mayor de 1.2 se establece que el proceso es confiable requiriendo unicamente supervisi3n normal.

IX.5. RESULTADOS DE LA PRIMERA SIMULACION.

IX.5.1. Control de calidad del medio de cultivo, caldo de soya de tripticaseina.

IX.5.1.1 Determinación de pH.

pH obtenido = 7.2

IX.5.1.2. Prueba de esterilidad del medio de cultivo.

Después de 8 días se observa que no existe crecimiento alguno en el medio de cultivo, manteniéndose las características de color y transparencia.

Temperatura de incubación = 35-37 °C.

Tiempo de incubación 7 días.

IX.5.1.3. Prueba de promoción de crecimiento.

( control positivo )

Microorganismo utilizado: *Cándida albicans*.

Temperatura de incubación: 37 °C.

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Las colonias se acumulan en el fondo del matraz el crecimiento es abundante y su coloración es marfil.

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

Microorganismo utilizado: *Cándida albicans*.

Temperatura de incubación: Temperatura ambiente.

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Las colonias se acumulan en el fondo del matraz, el crecimiento es tipo cremoso, color marfil y tiene brillo metálico.

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

Microorganismo utilizado: *Bacillus subtilis*.

Temperatura de incubación: 37 °C.

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Las colonias se acumulan en la superficie del matraz, crecimiento abundante tipo nata, color blanco opaco.

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

Microorganismo utilizado: *Bacillus subtilis*.

Temperatura de incubación: Temperatura ambiente.

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Su crecimiento es apenas perceptible por opalescencia en el medio de cultivo (turbidez).

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

El medio de cultivo cumple con los requerimientos para crecimiento de microorganismos.

**IX-5-2. Muestreo de componentes primarios (ampolletas).**

Temperatura de incubación: 35-37 °C.

Tiempo de incubación: 7 días.

Medio de cultivo: Caldo de soya de tripticaseina.

Sanitizante en turno: Fenol.

De los tres matraces ninguno presenta crecimiento.

El matraz utilizado como blanco no presenta contaminación.

El método empleado para sanitizar la ampollita es adecuado.

IX.5.3. Llenado aséptico prueba de simulación de proceso.

IX.5.3.1. Monitoreo microbiológico del Área aséptica.

Temperatura de incubación: 37 °C y 25 °C.

Tiempo de incubación: 72 horas y 120 horas.

A R E A 1

No de caja	Tipo de medio	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	Características macroscópicas morfológicas
1	CASOY	0	0	Consistencia cremosa Crecimiento color hueso Borde irregular
2	SELEC-TIVO	0	0	
3	CASOY	0	0	
4	SELEC-TIVO	0	0	
5	CASOY	1	0	
6	SELEC-TIVO	0	0	
7	CASOY	0	0	
8	SELEC-TIVO	0	0	

AREA MODULO DE FLUJO LAMINAR

No de caja	Tipo de medio	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	Características macroscópicas morfológicas
9	CASOY	0	0	
10	SELEC-TIVO	0	0	
11	CASOY	0	0	
12	SELEC-TIVO	0	0	
13	CASOY	0	0	
25	CASOY	0	0	
14	SELEC-TIVO	0	0	
24	SELEC-TIVO	0	0	

Cajas 14 y 24 expuestas en el pasillo de Areas 1 y 2.

A R E A 2

No de caja	Tipo de medio	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	Características macroscópicas morfológicas
15	CASOY	0	0	Consistencia cremosa Crecimiento color hueso Borde circular uniforme
16	SELEC-TIVO	0	0	
17	CASOY	0	0	
18	SELEC-TIVO	0	0	
19	CASOY	0	0	
20	SELEC-TIVO	0	0	
21	CASOY	1	0	
22	SELEC-TIVO	0	0	
23	CASOY	0	0	

## IX.5.3.2. Muestreo de superficies expuestas.

Temperatura de incubación: 37 °C y 25 °C.

Tiempo de incubación: 72 horas y 120 horas.

AREA	Bacter.	Hongos	Características macroscópicas morfológicas
1	U.F.C	U.F.C	
Techo	0	0	
Pared	0	0	
Piso	0	0	
AREA	Bacter.	Hongos	
2	U.F.C	U.F.C	
Techo	0	0	
Pared	0	0	
Piso	0	0	
AREA MODULO FLUJO LAMINAR	Bacter.	Hongos	
	U.F.C	U.F.C	
Techo	0	0	
Cortina	0	0	
Piso	0	0	
	Bacter.	Hongos	
	U.F.C	U.F.C	
Máquina llenadora Marzocc	0	0	
Guantes	0	0	



**IX.5.4. Control de ampolletas.**

Número de ampolletas llenadas: 3029

Número de ampolletas mal selladas: 290

Tiempo de incubación: 7 días.

Temperatura de incubación: 37°C y temperatura ambiente.

Número de personas presentes durante la simulación: 4

Tiempo de simulación: 2 horas.

Porcentaje de contaminación:

$$C = \frac{0}{3029 - 290} \times 100 = 0$$

No hubo contaminación alguna.

IX.6. RESULTADOS DE LA SEGUNDA SIMULACION.

IX.6.1. Control de calidad del medio de cultivo, caldo de soya de tripticaseina.

IX.6.1.1 Determnación de pH.

pH obtenido = 7.2

IX.6.1.2. Prueba de esterilidad del medio de cultivo.

Despues de 8 días se observa que no existe crecimiento alguno en el medio de cultivo, manteniéndose las características de color y transparencia.

Temperatura de incubación = 35-37 °C.

Tiempo de incubación 7 días.

IX.6.1.3. Prueba de promoción de crecimiento.

( control positivo )

Microorganismo utilizado: *Cándida albicans*.

Temperatura de incubación: 37 °C.

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Las colonias se acumulan en el fondo del matraz el crecimiento es abundante y su coloración es marfil.

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

Microorganismo utilizado: *Cándida albicans*.

Temperatura de incubación: Temperatura ambiente.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Las colonias se acumulan en el fondo del matraz, el crecimiento es tipo cremoso, color marfil y tiene brillo metálico.

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

Microorganismo utilizado: *Bacillus subtilis*.

Temperatura de incubación: 37 °C.

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Las colonias se acumulan en la superficie del matraz, crecimiento abundante tipo nata, color blanco opaco.

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

Microorganismo utilizado: *Bacillus subtilis*.

Temperatura de incubación: Temperatura ambiente.

Tiempo de incubación: 7 días.

Crecimiento: Positivo.

Características: Su crecimiento es apenas perceptible por opalescencia en el medio de cultivo (turbidez).

Medio utilizado: Caldo de soya de tripticaseina.

El medio de cultivo cumple con los requerimientos para crecimiento de microorganismos.

**IX.6.2. Muestreo de componentes primarios (ampolletas).**

**Temperatura de incubación: 35-37 °C.**

**Tiempo de incubación: 7 días.**

**Medio de cultivo: Caldo de soya de tripticaseína.**

**Sanitizante en turno: Alcohol.**

**De los tres matraces ninguno presenta crecimiento.**

**El matraz utilizado como blanco no presenta contaminación.**

**El método empleado para sanitizar la ampolla es adecuado.**

IX.6.3. Llenado aseptico prueba de simulación de proceso.

IX.6.3.1. Monitoreo microbiológico del Área aseptica.

Temperatura de incubación: 37 °C y 25 °C.

Tiempo de incubación: 72 horas y 120 horas.

A R E A 1

No de caja	Tipo de medio	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	Características macroscópicas morfológicas
1	CASOY	0	0	
2	SELEC-TIVO	0	0	
3	CASOY	0	0	
4	SELEC-TIVO	0	0	
5	CASOY		0	
6	SELEC-TIVO	0	0	
7	CASOY	0	0	
8	SELEC-TIVO	0	0	

AREA MODULO DE FLUJO LAMINAR

No de caja	Tipo de medio	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	Características macroscópicas morfológicas
9	CASOY	0	0	
10	SELEC-TIVO	0	0	
11	CASOY	0	0	
12	SELEC-TIVO	0	0	
13	CASOY	0	0	
25	CASOY	0	0	
14	SELEC-TIVO	0	0	
24	SELEC-TIVO	0	0	

Cajas 14 y 24 expuestas en el pasillo de Áreas 1 y 2.

A R E A 2

No de caja	Tipo de medio	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	Caracterfsticas macroscópicas morfológicas
15	CASQY	1	0	Consistencia cremosa Crecimiento color hueso Borde circular uniforme
16	SELEC-TIVO	0	0	
17	CASQY	0	0	
18	SELEC-TIVO	0	0	
19	CASQY	0	0	
20	SELEC-TIVO	0	0	
21	CASQY		0	
22	SELEC-TIVO	0	0	
23	CASQY	0	0	

IX.6.3.2. Muestreo de superficies expuestas.

Temperatura de incubación: 37 °C y 25 °C.

Tiempo de incubación: 72 horas y 120 horas.

AREA	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	Características macroscópicas morfológicas
1			
Techo	0	0	
Pared	0	0	
Piso	0	0	
AREA	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	
2			
Techo	0	0	
Pared	0	0	
Piso	0	0	
AREA MODULO FLUJO LAMINAR	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	
Techo	0	0	
Cortina	0	0	
Piso	0	0	
	Bacter. U.F.C	Hongos U.F.C	
Máquina llenadora Marzocc	0	0	
Guantes	0	0	



**IX.6.4. Control de ampolletas.**

Número de ampolletas llenadas: 3150

Número de ampolletas mal selladas: 250

Tiempo de incubación: 7 días.

Temperatura de incubación: 37°C y temperatura ambiente.

Número de personas presentes durante la simulación: 4

Tiempo de simulación: 2.5 horas.

Porcentaje de contaminación:

$$C = \frac{0}{3150 - 250} \times 100 = 0$$

No hubo contaminación alguna.

## X. DISCUSION DE RESULTADOS

Considerando las dos simulaciones se realiza la evaluación de los resultados obtenidos en el análisis de los factores críticos del proceso de llenado aséptico de la suspensión ingerible.

FACTOR CRITICO	CONDICION
Carga microbiana del agua.	Cumple.
Proceso de esterilización.	Cumple.
Esterilización del tanque contenedor.	Cumple.
Capacidad de proceso de la llenadora de ampolletas.	Cumple.
Esterilidad del aire comprimido que agita la biomasa.	Cumple
Calificación de área clase 100.	Cumple.
Sanitización confiable y eficaz.	Cumple.
Personal capacitado.	Cumple.
Uniformes de área aséptica.	Cumple.

Validación del proceso de llenado: las condiciones en que se efectúa indican que el personal conoce y controla el proceso de llenado por lo que realiza movimientos lentos y relacionados con su función. El personal no es una fuente de contaminación dado que porta el uniforme establecido para el área y no tiene contacto con la suspensión ingerible.

Durante la validación el monitoreo microbiológico indica que el sistema de control ambiental es efectivo, esto se refleja en los valores de UFC que no rebasan los límites establecidos para los diferentes puntos del área aséptica.

La sanitización de piso, paredes, techo y máquina es efectiva dado que su monitoreo reporta valores de UFC dentro de límites por lo que la forma de aplicar los sanitizantes y su rotación dan un sistema confiable y seguro.

La sanitización de ampollitas se evalúa durante el llenado dado que es una fuente potencial de contaminación para la suspensión, los resultados obtenidos durante la validación establecen que la sanitización es efectiva y confiable.

Se llenaron un total de 3029 ampollitas en la primera simulación y 3150 en la segunda cantidades mayores a la mínima establecida para validar un proceso de llenado aséptico.

Las ampollitas llenas, después de la incubación, no presentaron crecimiento de bacterias ni de hongos, es decir, están estériles lo que demuestra que el proceso es confiable, efectivo y reproducible dado que la influencia de todos los factores evaluados no afecta la pureza de la suspensión ingerible.

## XI. CONCLUSIONES

Los resultados indican que todos los factores críticos del proceso de llenado aseptico tiene un comportamiento predecible y controlado dado que el área clase 100 mantiene un número reducido de vectores de contaminación; el aire comprimido es totalmente estéril y libre de partículas, por otro lado, el agua utilizada en el área aseptica tiene una carga microbiana mínima con lo que se disminuyen las posibilidades de contaminación; las mangueras son inertes y no afectan las características de la suspensión ingerible; en lo que respecta a los uniformes, estos aíslan perfectamente al personal dentro del área y no permiten la difusión de partículas.

Los sistemas de sanitización y esterilización son definitivos en el control microbiológico del área dado que el primero no permite el crecimiento de microorganismos y el segundo evita que todo material empleado dentro del área lleve una carga microbiana.

El tanque contenedor aísla perfectamente a la suspensión ingerible evitando cualquier tipo de contaminación. La capacidad de proceso de la llenadora de ampollitas indica que todos los sistemas funcionan adecuadamente y únicamente requieren supervisión normal para mantenerla en perfectas condiciones. El personal, móvil que puede originar cualquier cambio positivo en el proceso de llenado aseptico, está plenamente capacitado y

realiza movimientos relacionados con el proceso y su control.

Se establece que la influencia de cada factor en el proceso de llenado aséptico de la suspensión ingerible no afecta sus características y evita al 100 % cualquier tipo de contaminación, esto se refleja en las simulaciones, ya que en ninguna se presentan ampollitas contaminadas.

El estudio de cada factor involucrado en el proceso de llenado aséptico, de una suspensión ingerible, permite predecir el comportamiento futuro del proceso para mantener condiciones estándar de operación. Con esto se proporciona la evidencia documental que demuestra la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de todos los factores involucrados en el proceso de llenado aséptico de la suspensión ingerible con lo que se cumple el objetivo planteado aceptándose la hipótesis planteada dado que no se encuentra contaminación en las ampollitas, en ninguna de las simulaciones dando, en consecuencia, un proceso validado.

## XII. RECOMENDACIONES

1. Establecer un programa de mantenimiento de la llenadora de ampolletas con el mínimo de salidas del área aséptica.
2. Optimizar el tiempo de esterilización del tanque contenedor para evitar pérdidas de tiempo.
3. Evaluar periódicamente el avance del programa de capacitación establecido para todo el personal que labore en el área aséptica.

### XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Wasynizunk J. "Validación del proceso de llenado en el área estéril/Pharm Technol.vol.10,Núm.5 may. 1986.
2. Curso."Validaciones de procesos asépticos." José M. Cardenas México,D.F.,1987.
3. Curso."Validación de procesos asépticos." Lamda Cientifica Julio 1987.
4. Byers J."Process validation in drug manufacture." Drugs y cosmetic ind. 1980.
5. Comité de redacción de guías generales de validación de la dirección general de control de insumos para la salud S.A.
6. Robert L., "FDA view of compliance problems related to validation of aseptic facilities." Presentado at the international society of pharmaceutical engineer/ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. march. 1986.
7. Benito David Curiel "Validación de procesos farmacéuticos." Asociación Farmacéutica Mexicana A.C,Centro Mexicano de desarrollo e investigación Farmacéutica México D.F. 1986.
8. Ollero B."Los sistemas expertos en control de procesos" Automat e instrum,núm,193, JUL. 1989.
9. Curso."Control de procesos."Luis Torres Rangel,Asociación de control estadístico de calidad.,1991.

10. Code of federal regulations title 21, pants. 200-299 US. government printing office, Washington april. 1985.
11. Gufa de procedimientos adecuados de cuartos limpios, comision interinstitucional de prácticas adecuadas de manufactura. México 1986.
12. G.-J. SLATER "Microbiological enviromental monitoring during esterile produc manufacture adaptacion of methods for a re-search facilitate." Journal parenteral science. april 1988.
13. Farmacopea de los ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, Secretaria de Salud quinta edición, México, 1988.
14. Curso. "Actualización sobre tecnología farmacéutica." Asociación Faramacéutica Politécnica julio-agosto, México D.F. 1985.
15. Sharp. J. "Control y manufactura de productos esteriles." parte 1/2/. Manuf. Chem. Vol. 60 Num. 2, Feb., 1984, P. 49+(3P).
16. Harder S.W. "The validation of cleaning procedures." Pharm. Tech. 29, may 1984.
17. Curso. "La termometria en el control de la calidad." Jaime Gonzales. INFOTEC México D.F., 1990.
18. "Calificación de la eficiencia funcional de la esterilización y despirogenización por calor seco para frascos antibióticos," Juan Aguilar Hernández" Universidad Nacional Autonoma de México E.N.E.P. Zaragoza, México D.F. 1988.
19. Fry, E.M. "Política de validación de procesos." Pharm. Industr., 46, 601 (1984).



20. Pharmaceutical science. Remington's. Mack Publishing Company. Easton Pennsylvania. 1965.
21. Sol Motola. Chairman. "Validation of aseptic filling for solution drugs products." Parenteral drug association. inc.
22. Statistical quality control handbook. Western Elezarik , company, Inc. New York. 1955  
C.I.F. Vol.4, Núm.8, 220, agosto 1985, 8.
23. Cameli J. P. "La validación, una filosofía y un sistema." C.I.F. Vol.4, Núm.8, 220, agosto 1985, 8.
24. Guías generales de validación para medios de cultivo. Subcomite de microbiología del comite de redacción de guías generales de validación de la Secretaria de Salud. México, D.F., 1990.
25. Hugh H.O.B.E. "Movement of airflow, peripheral entrainment and dispersion of contaminants". Journal of parenteral science december 1987.
26. Fernando D. "Validación de procesos para productos farmacéuticos no estériles". Searle de México S.A. de C.V., México D.F., septiembre de 1987.
27. Tercer curso internacional de tópicos sobre taxonomía genética y conservación de las levaduras y su aplicación en biotecnología. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Cuernavaca Morelos, México. octubre de 1989.

28. H.Chalomeu "Fundamentals of a microbiological environmental monitoring program." Journal of parenteral science y technology. mayo 1990.
29. USP XXII. The United States Pharmacopeia-twenty-second revision Mack company.Easton january 1990.
30. Angelina P.S."Validación de llenado estéril " UNAM. Mexico.D.F.1989.
31. Cattaneo,D.J."Criterios de validación para una industria farmacéutica"/Pharm Engr,vol.8,num.4,jul.-ago.1988,p.9-11.
32. Ralston,A.H.,et.al."Validación de sistemas en la industria farmacéutica a través de la planeación"/Pharm Engr,vol.8,nóm.4, jul.-ago. 1988,p.25-27.
33. Moreno C.W."Self learning optimizing systems." Drug Dev.and Ind. Pharm. vol.13,num.4 y 5, 729, 1987.
34. Dighe S-V."Process validation of sustained release products." Pharm. Tech. Conference.328, 1984.
35. Guidelines of general principles of process validation. FDA, Rockville Md. (marzo 29, 1983 y marzo 7, 1984).
36. PMA's Vaalidation advisory committee.Process Validations concepts for drug products.Pharm. Tech.vol.9, num.9,78, 1985.
37. Loftus B-T.,Nash P-A."pharmaceutical process validations." Maecel Dekker Inc. N.Y. 1984.
38. Yllala-Catalá M."La validación,un reto actual.Normas para la práctica de una correcta validación." C.I.F. vol.2,25, 1983.

39. James P. Agalloco Et Lotz., "Validation of aseptic,  
pharmaceutical processes-" New York, 1986.

40. Capman K.G. "The PAR approach to process validation." Pharm.  
Tech. 22, dic. 1984.