

TITULO: Metodología para el control microbiológico de áreas controladas.

TITLE: Methodology to microbiology checking in closed areas.

AUTORES:

1. Lic. Dailín Cobos Valdes.
2. Lic. Walter Góngora Amores.
3. Lic. Zuleidis Torres Ponce.
4. Ing. Bladimir Castañeda Comerón.

COLABORADORES:

5. Lic. Yamila Reyes Ávila.
6. Lic. Mirtha Beatriz Miranda Bazán.

PAÍS: Cuba

RESUMEN:

Se implementa una metodología para el control microbiológico de las áreas controladas del Centro de Inmunología y Biopreparados, reportando diferencias significativas en los resultados de la carga microbiológica de las áreas, su influencia en la disminución del porcentaje de rechazo de productos críticos y su repercusión en los resultados contables de nuestra institución. Como parte de la misma se desarrollan programas de limpieza, desinfección y monitoreo ambiental de las áreas limpias con el objetivo fundamental de garantizar que las producciones se realicen en ambientes adecuados y que las áreas controladas permanezcan dentro de los parámetros establecidos, para ello se establecen un conjunto de límites de alertas y de acción, de forma tal que se pueda evaluar el desempeño del área y tomar acciones correctivas cuando se requiera según los principios de Buenas Prácticas de Producción Farmacéutica.

PALABRAS CLAVES: METODOLOGIA; ÁREAS CONTROLADAS; BUENAS PRACTICAS DE PRODUCCIÓN FARMACÉUTICO; MONITOREO AMBIENTAL.

ABSTRACT:

A methodology to microbiology checking in the closed areas of the Center for Immunology and Biopreparations was presented. This methodology contributed to decrease of the reject percentage in the main products and as a consequence of this, report economic results for the center. The Development of cleaning program, disinfection and environment control in closed areas help to carried out production in safer environments and these areas are kept inside parameters, for that reason it's established a group of alert limit to evaluate how is the environment in these areas and take corrective actions as a result of pharmaceutical production best practices.

KEY WORDS: METHODOLOGY; CLOSED AREAS; PHARMACEUTICAL PRODUCTION BEST PRACTICES; ENVIROMENT CONTROL.

INTRODUCCIÓN

En la rama de producción de biológicos, los procesos son complejos y requieren un escrutinio analítico más extensivo para asegurar, de esta forma, la consistencia requerida entre lotes y que se conserve la integridad molecular del componente activo del producto.

A diferencia de los productos farmacéuticos convencionales, que normalmente son producidos y controlados con el empleo de técnicas químicas y físicas reproducibles, los biológicos se obtienen empleando métodos que presentan una variabilidad intrínseca, así como controles que conllevan el uso de técnicas de análisis biológicas, las que presentan a su vez una mayor variabilidad que las determinaciones físico-químicas, por lo que el diseño del producto y de las condiciones de producción así como el cumplimiento de las Buenas Prácticas asumen una importancia crucial en este tipo de producción debido a que pueden no detectarse desviaciones que pudieran incidir de forma adversa en la calidad, seguridad y eficacia del producto biológico.

El Centro de Inmunología y Biopreparados (Cibho) se dedica a la producción de hemoderivados de origen animal; unos como medios de cultivo para diagnósticos microbiológicos y crecimiento celular y otros como medicamentos para el consumo humano.

En el año 2002 la vigilancia ambiental de las áreas controladas, no cumplía con los requisitos necesarios para lograr ambientes seguros y productos microbiológicamente controlados. En el mes de abril del 2003 se implementó una nueva metodología para el control microbiológico de las áreas controladas, que contribuyó a reducir el porcentaje de rechazo por microbiología de productos como la Sangre Bovina Estéril (SBE), (materia prima fundamental para la producción del Trofin Vital) y la Sangre Total de Carnero (STC) (producto final empleado para el suplemento de medios de cultivo), por ser los renglones más propensos a la contaminación microbiana debido a su composición, método de obtención y ensayo (Special Scientific Forum on Enviromental Monitoring , 1999; Farmacopea, 1995).

La nueva metodología consta de cuatro etapas fundamentales desglosadas en varios pasos que abarcan desde la caracterización de las áreas controladas hasta la evaluación de su eficacia.

MATERIALES Y METODOS.

Se emplearon módulos de ropa para áreas asépticas y guantes quirúrgicos previamente esterilizados, así como alcohol al 70 % como antiséptico para el trabajo en las áreas controladas.

Aislamiento

Se emplearon placas petri de 10 mL con Agar Triptona Soya (ATS) como medio de cultivo específico para bacterias.

Nueva Metodología Empleada

En el año 2003 se implementó una nueva metodología para lograr una mejor vigilancia ambiental en las áreas controladas. Este programa de muestreo para el monitoreo ambiental incluye la determinación cuantitativa de microorganismos presentes en el ambiente y la determinación cualitativa de algunos patógenos o indicadores dependiendo de los ensayos que se realizan en las áreas (Sehulster, 2003).

Etapas I: Análisis de las áreas controladas.

Paso I.1: Análisis por área de los puntos críticos.

Se definieron los puntos críticos en cada área controlada según las actividades que se realizan en cada una de ellas. El área de microbiología cuenta con 7 puntos críticos (piso del pre-box, meseta del laboratorio, piso del laboratorio, meseta metálica, meseta del área de siembra, cabina de flujo laminar y piso del cuarto de siembra). El área de Trofin-Vital presenta 11 puntos críticos (piso de incubación, meseta de incubación, transfer de incubación, piso de hidrólisis, meseta de hidrólisis, transfer de hidrólisis, piso del pre-box, transfer de llenado, meseta metálica, piso de llenado y cabina de flujo laminar).

Paso I.2: Normalización de los límites de acción.

Se establecieron los límites de acción del número de unidades formadoras de colonia para cada punto, teniendo en cuenta la documentación generada en la transferencia tecnológica del Trofin Vital realizada por el Centro Nacional de Biopreparados y los requisitos para áreas controladas según especificaciones de las entidades regulatorias (Directrices, 2000; Trofin Vital, 2001).

Paso I.3: Caracterización Microbiológica de las áreas

Se llevó a cabo teniendo en cuenta las actividades que se realizan en cada área controlada y las características microbiológicas de las materias primas y productos que forman parte del flujo de materiales en las mismas. Algunas de las materias primas y productos finales analizados constituyen un medio de cultivo propicio para el crecimiento de microorganismos, ya sean ambientales o patógenos.

Paso I.3.1: Clasificación e Identificación de los microorganismos

Se realizaron frotis en láminas portaobjetos de las diferentes colonias obtenidas para clasificar los microorganismos ambientales aislados en gram positivos o gram negativos según método de tinción Gram (Gram, 1984). La observación de las láminas se realizó en microscopio Olympus con objetivo de inmersión 100X.

Los microorganismos aislados se identificaron hasta género empleando medios de cultivo diferenciales.

Paso I.4: Evaluación del estado microbiológico de las áreas.

Se realizó tomando como parámetro el número de unidades formadoras de colonias por placas detectado en cada monitoreo ambiental. Para el conteo se empleó un contador de colonias CC-50, y este dato se empleó además para evaluar la eficacia de la limpieza y desinfección de las áreas controladas en cada ocasión. Se establecieron tres categorías evaluativas de acuerdo al límite de acción especificado en el sistema para cada punto de muestreo y la ubicación de este en el área, teniendo en cuenta que en dichas áreas se cumple el principio de caja en caja: Conforme, Autorizada y No Conforme (Control Microbiológico del aire en áreas controladas, 2002).

Paso I.5: Determinación de frecuencia de monitoreos por área.

Se estableció la sistematicidad con la que se realiza el monitoreo ambiental teniendo en cuenta la frecuencia de uso de las áreas y los resultados previos con la anterior metodología. Se monitoreo el aire por la técnica de placas expuestas en reposo, según procedimiento establecido en nuestro sistema de gestión de la calidad, empleando como medio de cultivo ATS, con un tiempo de exposición de 1h en cada punto crítico establecido en las áreas controladas. Las placas se incubaron 48 h a 37 °C (Implantación de medidas correctivas, 2002).

Etapla II: Rotación de desinfectantes

Paso II.1: Análisis de los desinfectantes a emplear

La caracterización microbiológica de las áreas controladas y las actividades que en ellas se realizan determinan el tipo de desinfectante a emplear. Las características generales de los mismos, así como los principios y recomendaciones para su uso también influyen en la selección. Se utilizan desinfectantes de ambiente (gases de formol con permanganato de potasio y gases de propilenglicol) y desinfectantes de superficie (fenol, lisol, surfalyse, bactelyse), en dependencia de la disponibilidad en el mercado de salud y siguiendo el programa de desinfectantes del Centro (Implantación de medidas correctivas, 2002).

Paso II.2: Rotación de los desinfectantes a seguir.

La rotación de desinfectantes está encaminada a impedir la adaptación de los microorganismos en las áreas controladas (Requisitos del Sistemas de Gestión de La Calidad, 2001). Esta rotación coincide para cada área controlada, pero no se emplean iguales desinfectantes al mismo tiempo, ya que en ellas se realizan actividades diferentes y por ende la carga microbiana difiere en ambas.

Etapla III: Control y mejora continua.

Paso III. 1: Confección de Registros de Control (RC).

RC de limpieza y desinfección de áreas asépticas para verificar la forma en que se realiza esta actividad y el cumplimiento de la rotación de desinfectantes.

RC de resultados del monitoreo del aire por la técnica de placas expuestas como documento que permite evaluar la calidad de la limpieza y desinfección realizada. Estos resultados se discuten en el seno de ambos colectivos de

forma semanal y de forma mensual, semestral y anual en los Consejos de Dirección.

Paso III. 2: Mejora continua.

El proceso de mejora continua es uno de los principios básicos de todo Sistema de Gestión de Calidad (Requisitos del Sistema de Gestión de La Calidad, 2001). El establecimiento de indicadores de rechazo y conformidad y su evaluación sistemática, permitirán desarrollar acciones correctivas encaminadas al perfeccionamiento de la metodología para el control microbiológico implantado.

Etapas IV. Evaluación integral de la nueva metodología.

Paso IV.1: Estudios comparativos.

Estudios comparativos anuales para demostrar el rol de la nueva metodología en la disminución del porcentaje de rechazo por microbiología de materias primas y productos finales.

Estudios comparativos anuales para gestionar la eficacia de la nueva metodología analizando los resultados obtenidos en las áreas controlada del Cibho.

RESULTADOS DEL TRABAJO

Estado microbiológico de las áreas:

Se realizaron monitoreos sistemáticos con una frecuencia semanal con el fin de evaluar el estado de las áreas. En las mismas se aislaron principalmente dos tipos de colonias, unas de color blanco, redondeadas y lisas correspondientes a bacilos aerobios gram positivos y las otras de color amarillo (o naranjas en algunos casos), de menor tamaño, redondeadas y lisas, correspondientes a *Sporosarcinas* aerobias gram positivas de forma cocoide, agrupadas en tétradas y diplococos. Los microorganismos aislados constituyen contaminantes ambientales, por lo que no se detectaron cepas patógenas perjudiciales tanto para los productos como para el personal, siendo un requisito fundamental en nuestro sistema de Gestión de la Calidad. Las dificultades radicaron en el elevado número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en algunos puntos de cada área según las especificaciones establecidas, lo que trajo como consecuencia que las áreas resultaran no conformes o autorizadas, interrumpiendo así el flujo de trabajo que se lleva en las mismas.

Los resultados obtenidos en el 2005 se compararon con los obtenidos en igual período del año 2004, disminuyendo el porcentaje de no conformidad en el área de Microbiología de un 7,1% hasta un 0% y en el área de Trofin-Vital de un 14,3% hasta un 0%. Se disminuyó el porcentaje de autorizo en el área de Trofin-Vital de un 25,7% hasta un 16,22% y en el área de Microbiología de un 33,3% hasta un 27,66% (Ver Gráficos 1 y 2, Anexos 1A y 1B).

Aumentó el porcentaje de conformidad en las áreas de Microbiología de un 59,6% hasta un 72,34% y Trofin-Vital de un 60% hasta un 83,78%. (Ver Gráficos 1 y 2, Anexos 1A y 1B).

En el área de microbiología el punto de muestreo de mayor dificultad fue el piso del pre-box. En el área de Trofin-Vital los puntos de muestreo de mayor dificultad fueron los locales de Incubación e Hidrólisis. A pesar de que ambos locales tienen el mismo diseño arquitectónico, en ellas se realizan actividades diferentes, que influyen notablemente en sus condiciones microbiológicas. El flujo productivo, a pesar de ser mayor en el área de Trofin-Vital, exige la realización de limpiezas y desinfecciones profundas al finalizar la producción de cada lote (dos veces por semana), mientras que en microbiología solo se realiza esta actividad al finalizar cada semana de trabajo. Además la frecuencia de desinfección del ambiente mediante gases de formol y permanganato es mayor en el área de Trofin-Vital.

Se mantuvo en vigor el Plan de rotación de desinfectantes y se extendieron las inspecciones de Control de procesos a la supervisión de las actividades de limpieza de las áreas controladas. La nueva metodología diseñada y aplicada en el Cibho, surge como una estrategia para lograr un estricto control del ambiente, minimizando los riesgos de contaminación en las etapas de fabricación y ensayo de sus distintas líneas productivas, con la consiguiente disminución de los porcentajes de rechazo por este concepto. La metodología empleada anteriormente no lograba una caracterización real y representativa del estado microbiológico de las áreas, en este se evaluaba solamente un punto crítico (cabinas de flujo laminar) por área, sin tener en cuenta que el flujo unidireccional de materiales y personal dentro del área, crea turbulencias o corrientes que pueden modificar o alterar la composición microbiana de los puntos más internos.

El análisis del impacto económico de la disminución del porcentaje de rechazo por microbiología en el período 2002 – 2005, (Tablas 1.1 – 1. 3, Anexos 3A – 3C demuestra la eficacia de la nueva metodología implementada. En el caso de la SBE el porcentaje de rechazo disminuyó desde un 29,1 % en el año 2002 hasta un 4,03 % en el 2005, (Ver gráfico 3, Anexo 2A) reportándose un ahorro de 35 botellones equivalentes a \$ 2 738, volumen de materia prima empleado para producir 17 lotes de Trofin Vital, o sea, 8 859 frascos con un valor de \$ 53 754. El porcentaje de rechazo de la STC disminuyó desde un 4,62 % en el 2002 hasta un 0,34 % en el año 2005, ahorrándose 13 bolsas de sangre, equivalentes a \$ 1 076,92 y la posibilidad de procesar aproximadamente 2 964 muestras de pacientes (Ver gráfico 4, Anexo 2B).

Aunque para el estudio tomamos como referencia la SBE y la STC, todos los renglones que se obtienen ya sean materias primas o productos finales, forman parte de un Sistema de Gestión de la Calidad y por tanto, durante su flujo productivo son procesados en una o ambas áreas controladas, de ahí la importancia que se le atribuye a la nueva metodología para el control microbiológico por garantizar un ambiente de trabajo seguro con un riesgo ínfimo de contaminación microbiana.

CONCLUSIONES

1. Se demostró la eficacia de la nueva metodología implementada con la disminución del porcentaje de rechazo por microbiología en productos y materias primas, así como la disminución del porcentaje de no conformidad y de autorizo en las dos áreas.
2. Se erradicó el porcentaje de no conformidad en las dos áreas en el 2005 con respecto al 2004.
3. Se disminuyó el porcentaje de autorizo en un 9,48 % y 5,64% en las áreas de Trofin-Vital y Microbiología respectivamente.
4. La nueva metodología empleada contribuyó significativamente a la disminución del porcentaje de rechazo por microbiología en un 25,07 % y 4,28 % para la SBE y STC respectivamente.

Se demostró el impacto económico de la nueva metodología empleada para el control microbiológico aplicado, reportándose un ahorro de \$ 2 738,00 por concepto de SBE y \$ 1 076,92 por concepto de STC, en el período evaluado

BIBLIOGRAFÍA

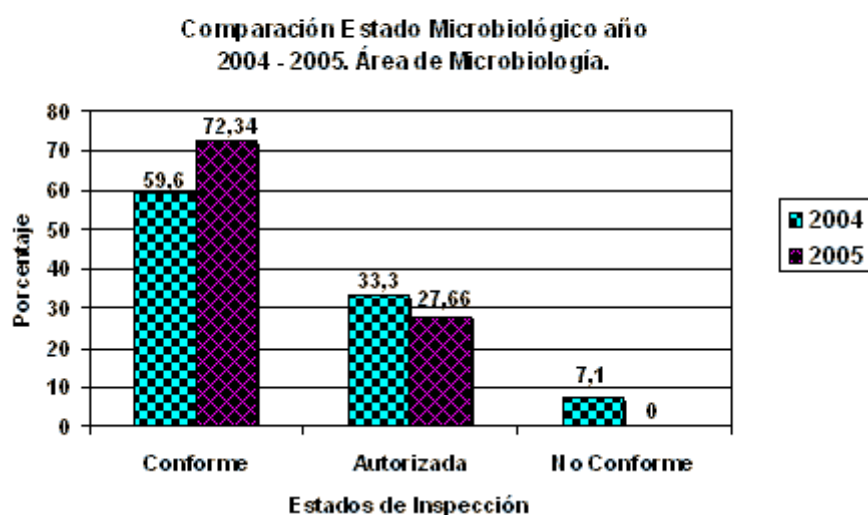
1. Control Microbiológico del aire en áreas controladas por la técnica de placas expuestas. Holguín; Centro de Inmunología y Biopreparados, 2002. 8 h (Procedimiento Normalizativo de Operación).
2. Directrices sobre buenas prácticas para la fabricación de productos farmacéuticos. La Habana; Centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos (CECMED), 2000. 19 h. (Regulación 16).
3. Gram Ch. Tinción de Gram: técnica de tinción diferencial de bacterias en muestras clínicas. [documento en línea] <http://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3ndeGram> [Consultado: 27 feb. 2006].
4. Implantación de medidas correctivas según resultados del monitoreo ambiental. Holguín; Centro de Inmunología y Biopreparados, 2002. 7 h (Procedimiento Normalizativo de Operación).
5. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos/Dirección General de Control de Insumos para la Salud. Suplemento 1: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6. ed. México: Centro de Documentación Institucional MX10.1, 1995. 1998 p.
6. Sehulster, L. Recommendations and Reports: Guidelines for environmental Infection Control in health care facilities. **MMWR Recommendations and Reports** (Atlanta) 52(RR10): 42, 2003.
7. Sistemas de Gestión de la calidad: requisitos. La Habana; Oficina Nacional de Normalización, 2001. 24 h. (Norma Cubana ISO 9001).
8. Special Scientific Forum on Enviromental Monitoring and Aseptic Procesing PDA. 1999. [documento en línea] www.pppmag.com/documents/V2N5/v2n5pp24-26_SurfaceTesting.pdf [Consultado: 28 mar.2007].

9. Trofin-Vital. Holguín; Centro de Centro de Inmunología y Biopreparados, 2001.
13 h. (Expediente Maestro).

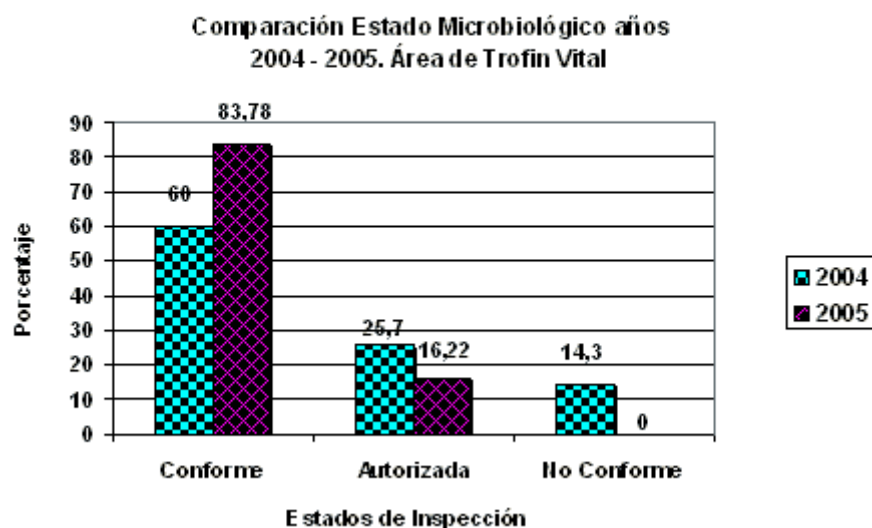
ANEXOS

ANEXOS

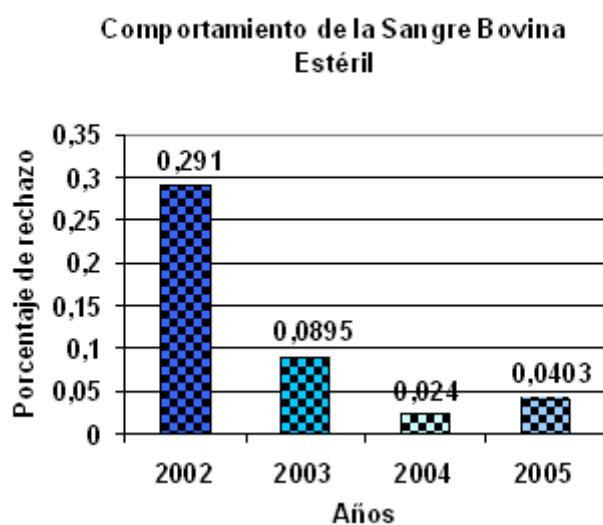
1. A. Gráfico1. Comparación estado microbiológico período 2004 – 2005.
Área de Microbiología.



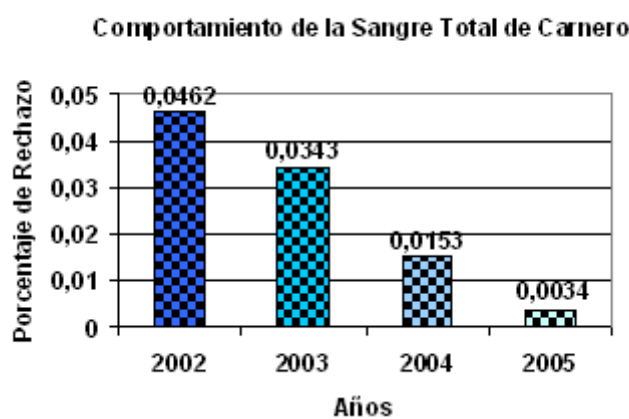
1. B. Gráfico 2. Comparación estado microbiológico período 2004 – 2005.
Área de Trofin Vital.



2. A. Gráfico 3: Comportamiento de la SBE desde el 2002-2005



2. B. Gráfico 4: Comportamiento de la STC desde el 2002-2005.



3. A. Tabla 1.1. Impacto económico período 2002 – 2003

Producto	2002		2003		Diferencia	
	Cantidad (L)	% Rechazo (%)	Cantidad (L)	% Rechazo (%)	Ahorro (L)	Valor (\$)
S. B. E	2 680	29,1	2 412	8,95	486,02 (27)	2 142,9
S. T. C	173,25	4,62	130,5	3,43	1,553 (4)	331,36

3. B. Tabla 1.2. Impacto económico período 2003 – 2004.

Producto	2003		2004		Diferencia	
	Cantidad (L)	% Rechazo (%)	Cantidad (L)	% Rechazo (%)	Ahorro (L)	Valor (\$)
S. B. E	2 412	8,95	2 202	2,4	144,231 (8)	714,27
S. T. C	130,5	3,43	117	1,53	2,223 (5)	414,2

3. C. Tabla 1.3. Impacto económico período 2004 – 2005.

Producto	2004		2005		Diferencia	
	Cantidad (L)	% Rechazo (%)	Cantidad (L)	% Rechazo (%)	Ahorro (L)	Valor (\$)
S. B. E	2 202	2,4	2 232	4,03	- 36,38 (2)	- 119,00
S. T. C	117	1,53	132,30	0,34	1,57 (4)	331,36

DATOS DE LOS AUTORES

Nombre:

1. Lic. Dailín Cobos Valdes. Lic. Microbiología. Profesor Instructor
2. Lic. Walter Góngora Amores. Lic. Microbiología
3. Lic. Zuleidis Torres Ponce. Lic. Biología. Profesor Instructor
4. Ing. Bladimir Castañeda Comerón. Ing. Químico

COLABORADORES:

5. Lic. Yamila Reyes Ávila. Lic Microbiología Clínica.
6. Lic. Mirtha Beatriz Miranda Bazán. Lic. en Educación Especialidad de Biología.

Correo:

1. dailin@cibho.hlg.sld.cu
2. wga@cibho.hlg.sld.cu
3. zule@cibho.hlg.sld.cu
4. blad@cibho.hlg.sld.cu
5. yamila72@cibho.hlg.sld.cu
6. mbeatrizmb@cibho.hlg.sld.cu

Centro de trabajo:

Centro de Inmunología y Biopreparados. Ave de Los Álamos entre Ave. Lenin y Calle Mariana de La Torre. CP. 80 100. Holguín.
Teléfono: (53) (24) 427663. Fax: (53) (24) 427664.