

TESIS DOCTORAL

Hospital Regional Universitario de Málaga
Universidad de Málaga, Facultad de Medicina

CONTROL DE LA BIOCONTAMINACIÓN EN ZONAS DE AMBIENTE CLASIFICADO DESTINADAS A LA FABRICACIÓN ASÉPTICA DE MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS.

Antonio Rodríguez Acosta
Málaga, Junio de 2017

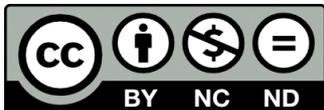


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Antonio Andrés Rodríguez Acosta

 <http://orcid.org/0000-0002-5389-9182>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dña. LAURA LEYVA FERNÁNDEZ, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA, DIRECTORA TÉCNICA DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN CELULAR DEL HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO DE MÁLAGA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MÁLAGA (IBIMA),

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta D. ANTONIO RODRÍGUEZ ACOSTA, con el título “**Control de la Biocontaminación en zonas de ambiente clasificado destinadas a la Fabricación Aséptica de Medicamentos de Terapias Avanzadas**” ha sido realizado en la Unidad de Producción Celular del Hospital Regional Universitario de Málaga, perteneciente al IBIMA, bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, lo firmo en Málaga, a 20 de Junio de 2017.

Fdo. Dra. Laura Leyva Fernández.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



D. JOSÉ PAVIA MOLINA DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA (ÁREA DE FARMACOLOGÍA) DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA,

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta D. ANTONIO RODRÍGUEZ ACOSTA, con el título “**Control de la Biocontaminación en zonas de ambiente clasificado destinadas a la Fabricación Aséptica de Medicamentos de Terapias Avanzadas**” ha sido realizado en la Unidad de Producción Celular del Hospital Regional Universitario de Málaga, perteneciente al IBIMA, bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, lo firmo en Málaga, a 20 de Junio de 2017

Fdo. Dr. José Pavia Molina.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Yo, Antonio Rodríguez Acosta, declaro que soy el autor del presente trabajo de investigación cuyo título es **“Control de la Biocontaminación en zonas de ambiente clasificado destinadas a la Fabricación Aséptica de Medicamentos de Terapias Avanzadas”**. El trabajo ha sido realizado en la Unidad de Producción Celular del Hospital Regional Universitario de Málaga, perteneciente al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), bajo la dirección de las Dra. Laura Leyva Fernández y el Dr. José Pavía Molina.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga, a 20 de Junio de 2017

Fdo: Antonio Rodríguez Acosta.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores, Pepe Pavía y Laura Leyva. Gracias a ellos he adquirido una formación y conocimientos muy valiosos y me han aportado el rigor científico del que carecía.

A los Facultativos del Servicio de Microbiología del Hospital Regional Universitario de Málaga, Begoña Palop, José Porras, Concepción Mediavilla e Inmaculada del Toro por el apoyo prestado y asesoramiento microbiológico recibido. Especialmente a Inmaculada, por su colaboración desinteresada y su paciencia infinita.

A mis compañeros de la Unidad de Producción Celular, que han colaborado para que este trabajo sea posible y me han soportado tras los días de insomnio, sin vuestra ayuda jamás lo hubiese terminado: Juan Antonio, Rafa, María, David, Vanessa, Ana y por supuesto a María Victoria.

A la Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas, a Gloria y Nati por crear el ambiente necesario para que este tipo de terapias sean una realidad y darme la oportunidad de incorporarme a este proyecto. Y por muchas cosas más.

Laura, no puedo agradecerte lo mucho que me has aportado, tanto en lo personal como en lo académico. Has supuesto una guía en mi carrera profesional y has sido la referencia que durante muchos años no he tenido. Es un honor trabajar contigo, deseo que juntos sigamos mejorando.

Al Dr. Miguel Canis, por mostrarme el camino.

A mis Padres por ser eso, mis padres. Por inculcarme los valores que me han llevado hasta aquí. Sois mi referente y un ejemplo de fortaleza.

A Mabel, por ser la persona más especial que he conocido y conoceré, por tus valores y amor sincero. Haces que cada día me sienta el hombre más afortunado, no puedo expresar aquí lo mucho que significas en mi vida. Y como no, a nuestros hijos José, Javi y Jorge, nuestras jotas, por estar. Habéis sido muy deseados.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A Maivi.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS UTILIZADOS

ASHRAE: Asociación Americana de Ingenieros de Calefacción, Refrigeración y Aire Acondicionado, del inglés *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers*.

ATCC: Colección Americana de Tipos de Cultivo, del inglés *American Type Culture Collection*.

BPC: Buena Práctica Clínica, del inglés *Good Clinical Practice (GCP)*.

CAT: Comité para Terapias Avanzadas, del inglés *Committee for Advanced Therapies*.

CE: Comisión Europea.

CEE: Consejo de las Comunidades Europeas.

CFG: Centrifuga.

CFL: Cabina de Flujo Laminar.

CHMP: Comité de Productos Medicinales de Uso Humano, del inglés *Committee for Medicinal Products for Human Use*.

CL: Climatizador.

CMMTA: Células Mesenquimales Troncales adultas derivadas de Tejido Adiposo.

DI: Distribuidor.

DMEM: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

E: Especificidad.

EC: European Commission.

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica.

EMA: Agencia Europea del Medicamento, del inglés *European Medicines Agency*.

FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos, del inglés *Food and Drug Administration*.

FMEA: Modo de Error y análisis de Efectos, del inglés *Failure Mode and Effects Analysis*.

FN: Falsos Negativos.

FP: Falsos Positivos.

FTA: Árbol DE Análisis de Errores, del inglés *Fault Tree Analysis*.

FVE: Fracción Vásculo-estromal. HACCP: Análisis de Riesgo y Puntos de Control Críticos, del inglés *Hazard Analysis and Critical Control Points*.

HEPA: Filtro de Alta Eficiencia para la Retención de Partículas, del inglés *High Efficiency Particle Arresting*.

HMP: Human Microbiome Project.

HRU: Hospital Regional Universitario.

HVAC: Sistema de Ventilación, Calefacción y Aire Acondicionado, del inglés *Heating, Ventilating and Air Conditioning*

ICH: Conferencia Internacional de Armonización, del inglés *International Conference on Harmonisation*.

IEST: Instituto de Ciencias Ambientales y Tecnología, del inglés *Institute of Environmental Sciences and Technology*.

INC: Incubador.

ISO: Organización Internacional de Estandarización, del inglés *International Organization for Standardization*.

MCC: Medio de Conservación de Congelación.

NCF: Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (del inglés *Good Manufacturing Practices, GMP*).

NCPF: Colección Nacional de Hongos Patógenos, *National Collection of Pathogenic Fungi*.

NCTC: Colección Nacional de Tipos de Cultivo, del inglés *National Collection of Type Cultures (colección inglesa)*.

PAA: Ácido Peracético, del inglés *Peracetic Acid*.

PBS: Tapón Fosfato Salino, del inglés *Phosphate Buffered Saline*.

PCB: Plan de Control de la Biocontaminación

PCC: Puntos de Control Críticos.

PMA: Programa de Muestreo Ambiental.

QACs: Compuestos de amonio cuaternario.

S: Sensibilidad.

SAS: Esclusa para el paso de materiales, en inglés *Safety Access System (Special Airlock System)*.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SP: Sala de producción.

SPS: Polianetol Sulfato Sódico, del inglés *Sodium Polianethole Sulphonate*.

THIO: Tioglicolato, del inglés *Thioglycollate*.

TSA: Agar Tripticasa Soja, del inglés *Trypticase Soy Agar*.

TSB: Caldo de Tripticasa de Soja, en inglés *Trypticase Soy Broth*.

Ufc: Unidades Formadoras de Colonias.

ULPA: Filtro de Aire de Penetración Ultra Baja, del inglés *Ultra Low Penetration Air*.

UNA: Una Norma Española.

UPC: Unidad de Producción Celular.

USP: Farmacopea Americana, den inglés *United States Pharmacopeia*.

UV: Ultravioleta.

VB: Vestuario. Grado B de clasificación ambiental según NCF.

VC: Vestuario. Grado C de clasificación ambiental según NCF.

VD: Vestuario. Grado D de clasificación ambiental según NCF.

VN: Verdaderos Negativos.

VP: Verdaderos Positivos.

VPN: Valor Predictivo Negativo.

VPP: Valor Predictivo Positivo.

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Medicamentos de terapias avanzadas.....	1
1.1.1.	Tipos de medicamentos de terapias avanzadas.....	2
1.2.	Marco normativo de las Terapias Avanzadas.....	4
1.2.1.	Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos.....	5
1.2.2.	Normas de Buena Práctica Clínica. consideraciones sobre medicamentos en investigación para uso humano y ensayos clínicos con medicamentos.	7
1.3.	Fabricación aséptica de medicamentos estériles	8
1.4.	Instalaciones para la fabricación aséptica de medicamentos.....	10
1.4.1.	Generalidades.....	10
1.4.2.	Grados de clasificación ambiental.....	11
1.4.3.	Sistema HVAC.....	13
1.4.4.	Normas de vestuario y comportamiento en zonas de ambiente controlado.....	18
1.4.5.	Mantenimiento del grado de clasificación ambiental	26
1.4.6.	Plan de Limpieza y Desinfección de áreas clasificadas	27
1.5.	Plan de Control de la Biocontaminación Ambiental	32
1.5.1.	Análisis de los resultados del PMA. Análisis de Tendencias.....	34
1.5.2.	Métodos utilizados para el control microbiológico ambiental	35
2.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	41
3.	OBJETIVOS.....	45
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
4.1.	Cuestiones previas.....	49
4.1.1.	Descripción de la instalación.....	49
4.1.2.	Actividad de la Unidad de Producción Celular	53
4.1.3.	Medidas generales para evitar la biocontaminación del área clasificada	57
4.2.	Objetivo 1. Demostrar la idoneidad de los medios de cultivo microbiológico y métodos de muestreo para la monitorización ambiental del área clasificada y la verificación de la esterilidad de los medicamentos fabricados.	64
4.2.1.	Medios de cultivo utilizados en los controles microbiológicos.....	64
4.2.2.	Control de calidad de medios de cultivo. Ensayos de promoción de crecimiento.....	68
4.2.3.	Efecto de la deshidratación sobre placas de TSA utilizadas para los muestreos volumétricos de aire y sedimentación de partículas.....	70
4.2.4.	Capacidad de las placas utilizadas para los controles de superficies de neutralizar los agentes desinfectantes.....	70
4.2.5.	Técnicas de muestreo microbiológico ambiental	72
4.2.6.	Demostrar la idoneidad de los medios de cultivo microbiológico y métodos de muestreo para la verificación de la esterilidad de los medicamentos fabricados.....	78
4.3.	Objetivo 2. Diseñar e implantar los procedimientos de limpieza necesarios para preservar las condiciones ambientales exigidas para la fabricación aséptica de medicamentos en la UPC.	85
4.3.1.	Validación de la capacidad germicida de los agentes desinfectantes utilizados.....	85
4.3.2.	Diseño, validación e implantación de un procedimiento de limpieza adaptado a las necesidades de la instalación.	89

4.4.	Objetivo 3. Identificar los puntos críticos de riesgo de biocontaminación ambiental en el proceso de fabricación aséptica implantado.....	95
4.4.1.	ETAPA 1: Recogida de datos previos y realización de análisis de riesgos.....	95
4.4.2.	Implantación del Plan de Control de la Contaminación Ambiental	114
4.5.	Objetivo 4. Análisis de resultados de biocontaminación ambiental obtenidos. Análisis de Tendencias.....	125
5.	RESULTADOS	129
5.1.	Objetivo 1. Demostrar la idoneidad de los medios de cultivo microbiológico y métodos de muestreo para la monitorización ambiental del área clasificada y la verificación de la esterilidad de los medicamentos fabricados.	129
5.1.1.	Ensayos de promoción de crecimiento de los medios utilizados.....	129
5.1.2.	Efecto de la deshidratación sobre placas de TSA utilizadas para los muestreos volumétricos de aire y sedimentación de partículas.....	131
5.1.3.	Capacidad neutralizante los agentes desinfectantes de las placas utilizadas para los controles de superficies.....	132
5.1.4.	Evolución de las técnicas y condiciones de cultivo microbiológico en la Unidad de Producción Celular HRU de Málaga	132
5.1.5.	Validación del ensayo de esterilidad según Ph. Eur. 2.6.27 mediante el sistema BACTEC FX40	135
5.2.	Objetivo 2. Diseñar e implantar los procedimientos de limpieza necesarios para preservar las condiciones ambientales exigidas para la fabricación aséptica de medicamentos en la UPC.	155
5.2.1.	Demostración de la capacidad germicida de los desinfectantes utilizados.....	155
5.2.2.	Diseño, validación e implantación de un procedimiento de limpieza adaptado a las necesidades de la instalación.	158
5.3.	Objetivo 3. Identificar los puntos críticos de riesgo de biocontaminación ambiental en el proceso de fabricación aséptica implantado.....	161
5.3.1.	ETAPA1: Recogida de datos previos y realización de análisis de riesgos.	161
5.3.2.	Establecimiento de un Plan de Control de la Biocontaminación diseñado a partir del análisis de los Puntos de Control Críticos.....	172
5.3.3.	ETAPA 2. Implantación de las medidas de control surgidas del análisis de riesgos.....	173
5.4.	OBJETIVO 4. Evaluar los datos de biocontaminación ambiental mediante herramientas basadas en análisis de tendencias. Valoración de la eficacia de los procedimientos implantados.	194
5.4.1.	Análisis de tendencias del muestreo volumétrico por años, en cada sala.....	206
5.4.2.	Análisis de tendencias del muestreo de superficies (placas de contacto) por años, en cada sala.....	208
6.	DISCUSIÓN	213
7.	CONCLUSIONES.....	237
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	243

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes tipos de partículas clasificadas en función de su diámetro.....	11
Figura 2. Climatizadores y enfriadora del sistema HVAC de la UPC.....	14
Figura 3. Esquema de flujo de aire en una sala GMP.....	15
Figura 4. Test de integridad de filtros. Fuente: elaboración propia.....	16
Figura 5. Anemómetro y caudalímetro para determinación de caudal y renovaciones de aire.....	16
Figura 6. Contador óptico de partículas.....	17
Figura 7. Fragmentos de piel.....	21
Figura 8. Personal de limpieza y personal de producción limpiando instalaciones y equipos, respectivamente.....	29
Figura 9. Plano de planta de la UPC del HRU de Málaga.....	50
Figura 10. Detalle de las Salas de Producción 1, 2 y 3.....	52
Figura 11. Esquema resumen del proceso productivo de medicamentos basados en CMMTAd.	57
Figura 12. Esquema mostrando los flujos de entrada y de salida de personal en el área clasificada y los puntos relevantes del proceso.....	58
Figura 13. Plano e imagen Vestuario B.....	60
Figura 14. Detalle del Almacén GMP (grado D)	62
Figura 15. Placa de agar TSA3.....	64
Figura 16. Placa de contacto tipo RODAC CT3P	65
Figura 17. Esquema de funcionamiento Bactec FX40.....	80
Figura 18. Esquema del proceso de cálculo del inóculo inicial y de la efectividad de los desinfectantes a diferentes diluciones	87
Figura 19. Posibles fuentes de contaminación en el área clasificada.....	101
Figura 20. Actividades, comportamiento y flujo de entrada del personal (riesgo de biocontaminación).....	103
Figura 21. Flujos de entrada y de salida de materiales auxiliares (riesgo de biocontaminación).....	107
Figura 22. Flujos de entrada y actividades sobre el Material de Partida (riesgo de biocontaminación)	110

Figura 23. Circulación del aire a través del sistema HVAC (riesgo de biocontaminación).....	112
Figura 24: Modificación de las condiciones de cultivo a lo largo del tiempo.....	133
Figura 25. Incubación de un inóculo con una mezcla <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	134
Figura 26. Incubación de inóculo con una mezcla <i>S.aureus</i> y <i>Aspergillus</i>	134
Figura 27. Detalle del crecimiento conjunto de <i>P. aeruginosa</i> y <i>C. albicans</i>	135
Figura 28. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de <i>Staphylococcus aureus</i> en sistema Bactec FX.....	143
Figura 29. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de <i>Clostridium sporogenes</i> en sistema Bactec FX.....	145
Figura 30. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de <i>Bacillus subtilis</i> en sistema Bactec FX.....	147
Figura 31. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de <i>Candida albicans</i> en sistema Bactec FX.....	149
Figura 32. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en sistema Bactec FX.....	151
Figura 33. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de <i>Aspergillus niger</i> en sistema Bactec FX.....	153
Figura 34. Sensibilidad para la detección de <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> mediante sistema Bactec FX y medio TSB tradicional.....	153
Figura 35. Valor Predictivo Negativo para la detección de <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> por ambos métodos.....	154
Figura 36. Esquema de las monitorizaciones realizadas durante el periodo de recogida de datos.....	161
Figura 37: Número y (porcentaje) de microorganismos aislados en grado B. Muestras volumétricas. Primera etapa.....	166
Figura 38. Proporción de microorganismos aislados en los muestreos de superficies en grado B. Primera etapa.....	167
Figura 39. Tipos de microorganismos aislados en los muestreos volumétricos tras la implantación de medidas de control de biocontaminación.....	174
Figura 40. Tipos de microorganismos aislados en los muestreos de superficie tras la implantación de las medidas de control de la biocontaminación.....	177
Figura 41. Puntos con mayor índice de contaminación en grado B.....	178
Figura 42. Porcentaje de positividad por punto de muestreo en grado C.....	179

Figura 43. Porcentaje de positividad por punto de muestreo en grado D.....	179
Figura 44. Número total de partículas viables en grado A con indicación del número de positividades.....	181
Figura 45. Número de partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ en muestreos mensuales en grado B “en funcionamiento”.....	189
Figura 46. Número de partículas $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ en muestreos mensuales en grado B “en funcionamiento”.....	189
Figura 47. Número y (porcentaje) de microorganismos aislados en los muestreos volumétricos y de superficies.....	194
Figura 48. Géneros más comunes aislados en la monitorización volumétrica y de superficies.....	195
Figura 49. Gráfico de evolución de tendencias en SP1 en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	197
Figura 50. Gráfico de evolución de tendencias en SP2 en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	197
Figura 51. Gráfico de evolución de tendencias en SP3 en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	198
Figura 52. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario B en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	198
Figura 53. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario C en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	198
Figura 54. Gráfico de evolución de tendencias en Almacén GMP en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	199
Figura 55. Gráfico de evolución de tendencias en Distribuidor en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	199
Figura 56. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario D en muestreo volumétrico con niveles de alerta y acción	199
Figura 57. Gráfico de evolución de tendencias en SP1 en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción	201
Figura 58. Gráfico de evolución de tendencias en SP2 en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción	201
Figura 59. Gráfico de evolución de tendencias en SP3 en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción	202
Figura 60. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario B en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción	202

Figura 61. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario C en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción.....	202
Figura 62. Gráfico de evolución de tendencias en Almacén GMP en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción.....	203
Figura 63. Gráfico de evolución de tendencias en Distribuidor en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción.....	203
Figura 64. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario D en muestreo de superficies con niveles de alerta y acción.....	203
Figura 65. Detalle del número de entradas de personal realizadas a grado B durante los años 2012 a 2015.....	204
Figura 66. Comparación entre el promedio de ufc recuperadas en el muestreo de superficies en el Vestuario B y el número de entradas a grado B. Tendencia lineal de ambas series.....	205
Figura 67. Comparación entre el promedio de ufc recuperadas en el muestreo de superficies en el Vestuario C y el número de entradas a grado B. Tendencia lineal de ambas series.....	205
Figura 68. Comparación entre el promedio de ufc recuperadas en el muestreo de superficies en el Vestuario D y el número de entradas a grado B. Tendencia lineal de ambas series.....	206
Figura 69. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestreos volumétricos, grado B.....	207
Figura 70. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación Muestreos volumétricos, grado C.....	207
Figura 71. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación Muestreos volumétricos, grado D.....	208
Figura 72. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestreos de superficies, grado B.....	209
Figura 73. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestreos de superficies, grado C.....	209
Figura 74. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestreos de superficies, grado D.....	210

Índice de tablas

Tabla 1. Grados de clasificación ambiental establecidos en las NCF en función del número de partículas/m ³ de aire de los tamaños de $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y $\geq 5 \mu\text{m}$	12
Tabla 2. Límites de las Clases del Estándar ISO 14644-1.	12
Tabla 3: Correlación entre las clases ambientales de la norma ISO 14644-1 y los grados ambientales de las NCF.....	13
Tabla 4. Recuento total de microorganismos en varias zonas corporales en hombres y mujeres.....	19
Tabla 5. Recomendaciones de la IEST acerca de la vestimenta a utilizar en zonas de ambiente controlado.....	22
Tabla 6. Índice de contaminación de Austin.....	25
Tabla 7. Grado de clasificación ambiental en las diferentes zonas del área clasificada de la UPC.....	49
Tabla 8. Parámetros ambientales críticos de las diferentes salas del área clasificada.....	51
Tabla 9. Composición de los diferentes frascos de cultivo utilizados en el ensayo de esterilidad.....	68
Tabla 10. Condiciones de incubación para la realización de los ensayos de promoción de crecimiento en medios sólidos y líquidos.....	68
Tabla 11. Cambio en los medios y condiciones de cultivo.....	75
Tabla 12. Condiciones de cultivo establecidas en las diferentes normas consultadas.....	75
Tabla 13. Tiempos de contacto establecidos por los fabricantes de los biocidas.....	85
Tabla 14. Unidades formadoras de colonias en el inóculo inicial (N_0).....	86
Tabla 15. Puntos de muestreo para la validación de la limpieza del área clasificada.....	94
Tabla 16. Niveles de alerta y acción inicialmente establecidos.....	96
Tabla 17. Puntos de muestreo volumétrico de aire (previo al análisis de riesgos).....	97
Tabla 18. Puntos de muestreo por sedimentación de partículas viables (previo al análisis de riesgos).....	97
Tabla 19. Localización de puntos de muestreo de superficies (previo al análisis de riesgos)....	100
Tabla 20. Resumen de puntos de muestreo de partículas viables.....	100
Tabla 21. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos de Control para la entrada al área clasificada.....	104
Tabla 22. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos de Control de la contaminación	

generada por la presencia de personal.....	106
Tabla 23._Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos para el Material Auxiliar....	109
Tabla 24._Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos para el Material de Partida.	111
Tabla 25. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos para el Sistema HVAC.....	113
Tabla 26. Nueva localización de los puntos de muestreo volumétricos.....	114
Tabla 27. Nuevos puntos para muestreo de superficies tras Análisis de Riesgos.....	116
Tabla 28. Número y localización de los Puntos de muestreo volumétrico y sedimentación Cualificación Microbiológica de la Instalación.....	118
Tabla 29. Número y localización de los Puntos de muestreo de superficie. Cualificación Microbiológica de la Instalación.....	119
Tabla 30. Promoción de crecimiento en los diferentes tipos de placas. Unidades formadoras de colonias sembradas (Sembr.) y recuperadas (Recup.).....	130
Tabla 31. Unidades formadoras de colonias recuperadas tras cada periodo de deshidratación de las placas.....	131
Tabla 32. Efecto de los desinfectantes sobre la promoción de crecimiento de los diferentes microorganismos en las placas CT3P.....	132
Tabla 33. Unidades formadoras de colonias recuperadas tras las dos incubaciones.....	133
Tabla 34. Unidades formadoras de colonias recuperadas tras la siembra de una combinación de hongos y bacterias y la incubación de las placas a las dos temperaturas.....	134
Tabla 35. Resultados ensayo promoción del crecimiento. Idoneidad de los frascos Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y Lytic Anaerobic/F.....	136
Tabla 36. Resultados análisis sensibilidad y especificidad del ensayo mediante el Sistema Bactec FX.....	140
Tabla 37. Resultados fase de validación.....	140
Tabla 38. Resultados comparativos entre inóculos de 10 ufc y 5 ufc.....	141
Tabla 39. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con <i>S.aureus</i>	142
Tabla 40. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con <i>S.aureus</i>	142
Tabla 41. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.....	143
Tabla 42. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con <i>C.sporogenes</i>	144
Tabla 43. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo THIO con <i>C.sporogenes</i>	144
Tabla 44. VPN y Sensibilidad del medio Lytic Anaerobic/F y THIO.....	144

Tabla 45. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con <i>B.subtilis</i>	146
Tabla 46. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con <i>B.subtilis</i>	146
Tabla 47. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.....	146
Tabla 48. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con <i>C. albicans</i>	148
Tabla 49. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con <i>C. albicans</i>	148
Tabla 50. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.....	148
Tabla 51. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con <i>P. aeruginosa</i>	150
Tabla 52. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con <i>P. aeruginosa</i>	150
Tabla 53. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.....	150
Tabla 54. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con <i>A. niger</i>	152
Tabla 55. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con <i>A. niger</i>	152
Tabla 56. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.....	152
Tabla 57. Tiempo por cada inóculo microbiológico en mostrar un resultado positivo en el sistema Bactec FX.....	154
Tabla 58. Tiempos de contacto óptimo para ejercer actividad bactericida, fungicida y esporicida y tiempo de exposición ensayado para evaluar la actividad desinfectante en tubo.....	155
Tabla 59. Dilución máxima de cada biocida que supera los criterios de aceptación.....	156
Tabla 60. Capacidad bactericida, fungicida y esporicida de los diferentes biocidas sin diluir aplicados a superficies.....	157
Tabla 61: ufc recuperadas en placas de CT3P y SC3P de 55 mm de diámetro, tras las limpiezas semanales y mensuales, durante el Procedimiento de Validación de la limpieza.....	160
Tabla 62. Distribución de las monitorizaciones de partículas viables (N=97) a lo largo del periodo de recogida de datos.....	162
Tabla 63. Número y porcentaje de partículas totales en los muestreos volumétricos de los diferentes grados	162
Tabla 64. Resultados de partículas viables por muestreo volumétrico en cada punto de muestreo.....	163
Tabla 65. Número (%) de partículas totales en los muestreos de sedimentación de los diferentes grados	163
Tabla 66. Resultados de partículas viables en placas de sedimentación en cada punto de muestreo.....	164
Tabla 67. Número y porcentaje de partículas totales en los muestreos de superficies de los	

diferentes grados	163
Tabla 68. Resultados de partículas viables por muestreo de superficies en cada punto de muestreo.....	165
Tabla 69. Análisis de Puntos de Control Críticos (PCC).....	170
Tabla 70. Número de muestreos volumétricos realizados en cada uno de los grados tras análisis de riesgos.....	172
Tabla 71. Número de placas positivas y de las que superan los niveles de acción en los muestreos volumétricos tras análisis de riesgos.....	173
Tabla 72. Número de muestreos de superficie realizados en cada uno de los grados tras Análisis de Riesgos.....	174
Tabla 73. Número de placas positivas y de las que superan los niveles de acción en los muestreos de superficie tras Análisis de Riesgos.....	176
Tabla 74. Distribución temporal de las monitorizaciones de partículas viables. Tras Análisis de Riesgos.....	179
Tabla 75. Monitorizaciones de partículas viables en grado A que excedieron los límites establecidos en las NCF.....	181
Tabla 76. Criterios de aceptación establecidos en cualificación microbiológica según grados.....	181
Tabla 77. Número de muestras que superaron los criterios de aceptación establecidos en las NCF en cualificación microbiológica.....	182
Tabla 78. Puntos de muestreo de superficies con resultados positivos (crecimiento de alguna ufc) en las cualificaciones microbiológicas realizadas.....	184
Tabla 79. Capacidad desinfectante de los SAS pasamateriales.....	184
Tabla 80. Microorganismos aislados a partir de tejidos adiposos usados como materiales de partida. Sensibilidad a gentamicina y vancomicina.....	186
Tabla 81. Número de medios alicuotados y número de controles positivos.....	187
Tabla 82. Número y localización de las ufc de <i>Aspergillus</i> detectadas en los diferentes controles microbiológicos realizados a los incubadores INC-07 e INC-08.....	190
Tabla 83. Distribución temporal de los 4 géneros predominantes. Porcentaje del total de microorganismos (número de ufc).....	193
Tabla 84. Tipos de microorganismos aislados en los controles volumétricos de aire versus muestreos de superficies.....	194
Tabla 85. Resultados estadísticos de los nuestros volumétricos para el cálculo de niveles de alerta y acción.....	195
Tabla 86. Resultados estadísticos de los nuestros de superficies para el cálculo de niveles de	

alerta y acción.....200



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS

Los recientes progresos científicos alcanzados en campos como la biotecnología celular y molecular han permitido el desarrollo de alternativas terapéuticas novedosas y prometedoras como las Terapias Avanzadas que incluyen la Terapia Génica, la Terapia Celular Somática y la Ingeniería de Tejidos [1] con productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico.

Este campo emergente de la biomedicina ofrece nuevas oportunidades para el tratamiento o prevención de enfermedades y disfunciones en el ser humano. Los productos de Terapias Avanzadas pueden ser administrados con el fin de restaurar, corregir o modificar funciones fisiológicas ejerciendo acciones farmacológicas, inmunológicas o metabólicas. Es por ello, por lo que son considerados como medicamentos biológicos en el ámbito del anexo I de la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y el Consejo Europeo de 6 de noviembre de 2001 [1].

Estos productos medicinales son fabricados en zonas de “ambiente controlado” con el fin de asegurar o minimizar el riesgo de contaminación microbiológica, por ello, una de las cuestiones más importantes es la creación y mantenimiento de un sistema de monitorización ambiental que garantice un ambiente adecuado para su fabricación, y que cumpla con los criterios normativos en cuanto al nivel de biocontaminación ambiental, según el grado de limpieza del aire. Con este objetivo, se ha de establecer e implantar un sistema formal de Control de la Biocontaminación Ambiental que evalúe y controle todos los factores que pueden afectar a la calidad microbiológica de los procesos y productos fabricados [2].

Los medicamentos de Terapia Celular suponen un nuevo reto tanto para las Agencias Reguladoras como para los Fabricantes ya que, aunque le son de aplicación las mismas normas generales que para el resto de los fármacos, poseen grandes diferencias respecto a los medicamentos tradicionales en cuanto a su proceso de fabricación y control. En primer lugar, las oportunidades de automatización a gran escala aún son limitadas; en segundo lugar, se trata de productos que no pueden ser esterilizados al final de su fabricación y por ello, para ser considerados como productos estériles, han de fabricarse mediante los procedimientos y normas aplicables a la fabricación aséptica de medicamentos. Por último, suele tratarse de productos con una escasa vida media, con un período de caducidad, dependiendo del producto y de los excipientes, de tan sólo 24-48 horas.

1.1.1. Tipos de medicamentos de terapias avanzadas

Los medicamentos de Terapia Génica y Terapia Celular vienen definidos en la directiva Europea 2009/120/EC [3]. Los de Ingeniería de Tejidos y Medicamentos combinados en el Reglamento Europeo 1394/2007 [1].

1.1.1.a. Medicamento de Terapia Génica

Un medicamento de terapia génica es un medicamento biológico con las características siguientes [4]:

- incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, utilizado en seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica;
- su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia. Los medicamentos de terapia génica no incluyen las vacunas contra enfermedades infecciosas.

1.1.1.b. Medicamento de Terapia Celular Somática

La Comisión Europea establece que los Medicamentos de Terapia Celular Somática son aquellos que tienen las siguientes características [4]:

- Contienen o consisten en células o tejidos que han sido sometidos a una manipulación sustancial de forma que sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales relevantes para el uso clínico previsto han sido alteradas, o las células o tejidos no se pretendan destinar a la misma función esencial en el receptor que en el donante;
- Se presentan como poseedores de propiedades para ser utilizados o administrados en seres humanos con el fin de tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad a través de la acción farmacológica, inmunológica o metabólica de sus células o tejidos.

Dicha manipulación incluye la expansión o activación de poblaciones celulares autólogas ex vivo, tal como la inmunoterapia adoptiva, y la utilización de células alogénicas y xenogénicas asociadas con productos sanitarios empleados ex vivo o in vivo, tales como micro cápsulas, matrices y andamiajes intrínsecos, biodegradables o no biodegradables.

No se considerarán manipulaciones sustanciales las enumeradas a continuación (anexo I del Reglamento (CE) 1394/2007) [1]:

- Corte.
- Trituración.
- Moldeo.

- Centrifugación.
- Imbibición en disoluciones antibióticas o antimicrobianas.
- Esterilización.
- Irradiación.
- Separación, concentración o purificación celular.
- Filtrado.
- Liofilización.
- Congelación.
- Criopreservación.
- Vitricación.

1.1.1.c. Medicamento de Ingeniería de Tejidos.

Se define un producto de Ingeniería Tisular como aquel que [1]:

- a. contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, y
- b. del que se alega que tiene propiedades, se emplea o es administrado a las personas con el fin de regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano.

Un producto de ingeniería tisular podrá contener células o tejidos de origen humano, animal, o ambos. Las células o tejidos podrán ser viables o no. Podrá también contener otras sustancias, como productos celulares, biomoléculas, biomateriales, sustancias químicas, soportes o matrices.

Quedan excluidos de la presente definición los productos que contienen o están formados exclusivamente por células y/o tejidos humanos o animales no viables, que no contengan células o tejidos viables y que no ejerzan principalmente una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

Las células o tejidos se considerarán «manipulados por ingeniería» si cumplen al menos una de las condiciones siguientes [1]:

- las células o tejidos han sido sometidos a manipulación sustancial, de modo que se logren las características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para la regeneración, reparación o sustitución pretendidas. Las manipulaciones enumeradas en particular en el anexo 1 de las NCF no se consideran sustanciales,
- las células o tejidos no están destinados a emplearse para la misma función o funciones esenciales en el receptor y en el donante.

La distinción entre Productos Medicinales de Terapia Celular Somática y Productos de Ingeniería Tisular depende del mecanismo de acción. En el caso de los productos de Terapia Celular Somática, las células o tejidos ejercen una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, mientras que los Productos de Ingeniería Tisular son utilizados para la regeneración, reparación o sustitución.

1.1.1.d. Medicamento combinado de Terapia Avanzada.

Medicamento combinado de Terapia Avanzada será aquel que:

- incorpore, como parte integrante del mismo, uno o más productos sanitarios o uno o más productos sanitarios implantables activos, y
- cuya parte celular o tisular contenga células o tejidos viables, o
- cuya parte celular o tisular contenga células o tejidos no viables pero capaces de ejercer en el organismo una acción que pueda considerarse fundamental respecto de la de los productos sanitarios mencionados [1].

Para estos productos, independientemente del papel del producto sanitario, la acción farmacológica, inmunológica o metabólica de estas células o tejidos debe considerarse el modo principal de acción del producto combinado.

1.2. MARCO NORMATIVO DE LAS TERAPIAS AVANZADAS

Los medicamentos basados en Terapia Celular comprenden una amplia variedad de productos y pueden ser incluidos en varias categorías tales como Productos Medicinales de Terapias Avanzadas, trasplante de células o tejidos o productos de transfusión sanguínea, entre otros [5]. La inclusión en uno u otro grupo de los anteriores conlleva grandes diferencias en términos regulatorios y económicos.

La donación, obtención, evaluación, trazabilidad y actividades de codificación para el trasplante de células ha de cumplir con las normas y requisitos establecidos en varias Directivas y Directivas de la Comisión Europea [6]–[9]. La obtención, evaluación y trazabilidad de las actividades realizadas para la obtención de células sanguíneas con fines transfusionales, debe cumplir con la normativa de calidad y seguridad establecida para la sangre humana y componentes de la sangre humana reguladas por la Unión Europea [10]–[12].

En el caso de los medicamentos de Terapias Avanzadas basados en células, tejidos, sangre humana o componentes sanguíneos como materiales de partida, le son aplicables la misma regulación Europea para su donación, obtención o recolección, evaluación y trazabilidad tal y como se establece en el Reglamento 1394/2007 [1].

Los Productos Medicinales de Terapias Avanzadas han de ser fabricados en instalaciones y según los principios establecidos en las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (NCF) publicadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Las NCF son una trasposición de la Directiva 2003/94/CE [13] por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos de uso humano y de los medicamentos en investigación de uso humano y la Directiva 91/412/CEE [14] de medicamentos de uso veterinario.

Los utilizados para trasplante de células o tejidos han de fabricarse en establecimientos de tejidos que cumplan con los requerimientos establecidos en la Directiva 2006/86/CE [8] mientras que los productos sanguíneos utilizados para transfusiones de sangre se han de procesar en establecimientos autorizados de acuerdo con los requerimientos de la Directiva 2005/62/CE [15].

1.2.1. Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (NCF)

Las NCF de medicamentos y principios activos de la Unión Europea se publican como volumen 4 de la legislación de la Unión Europea-Eudralex [16] y se definen como “la parte de la garantía de calidad que asegura que los medicamentos son elaborados y controlados de acuerdo con las normas de calidad apropiadas para el uso al que están destinados” [17].

La Directiva 2001/83/CE (artículo 40) establece que los principios de las NCF y las directrices detalladas de los mismos son de aplicación a todas las operaciones de fabricación de medicamentos realizadas en España, incluso si el producto es fabricado con vistas a su exportación. Se incluye la fabricación total o parcial y las operaciones de división, acondicionamiento o presentación. Se exige igualmente para las importaciones de medicamentos procedentes de terceros países en un Estado miembro [4]. Esta Directiva fue modificada por la Directiva 2004/27/CE, obligando a los Estados miembros a enviar a la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (AEEM) una copia de la autorización de fabricación. La AEEM es la encargada de registrar esta información en la base de datos comunitaria y la administra en nombre de la Comunidad Europea [18].

La guía de NCF se estructura en dos partes de requisitos básicos y en anexos específicos. La parte I versa sobre los principios aplicables a la fabricación de medicamentos y, la parte II, a las sustancias activas empleadas como materiales de partida.

Los capítulos de la parte I sobre “requisitos básicos” están encabezados por los principios que definen las Directivas 2003/94/CE [13] y 91/412/CEE [19]. El capítulo 1 “Gestión de calidad” define el concepto fundamental de garantía de calidad, aplicado a la fabricación de medicamentos. De ahí en adelante, cada capítulo contiene un principio que señala los objetivos de la garantía de calidad y un texto dirigido a los fabricantes que detalla los aspectos esenciales a tener en cuenta para implantar ese principio.

La parte II se estableció más recientemente en base a la directriz desarrollada a nivel de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) publicada como ICH Q7A [20] sobre “sustancias activas farmacéuticas”, la cual se implementó en principio como anexo 18 de las NCF para su aplicación voluntaria en 2001. De acuerdo con lo establecido por los artículos 47 y 51 de las Directivas 2001/83/CE y 2001/82/CE respectivamente, y sus modificaciones, la Comisión adoptaría y publicaría unas directrices detalladas para las sustancias activas empleadas como materiales de partida.

Introducción

Por ello, dicho anexo 18 ha sido reemplazado por la parte II de la Guía de NCF, de aplicación tanto al sector de medicamentos humanos como veterinarios.

En la última actualización de la Guía de NCF (junio 2016), publicada por la AEMPS, se incorpora una nueva parte III sobre “Documentos relacionados con las NCF y otros documentos relacionados con las NCF” que recopila documentos relevantes para la correcta aplicación de las GMPs procedentes de la Comisión Europea y de la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Además, la AEMPS ha eliminado el anexo 20 que correspondía con la directriz ICH Q9 de gestión de riesgos para la calidad.

Además, hay una serie de anexos aplicables a determinadas áreas de actividad, siendo algunos de ellos específicos de determinados tipos de medicamentos (medicamentos estériles, medicamentos en investigación, radiofármacos, medicamentos veterinarios, gases medicinales, medicamentos a base de plantas medicinales, líquidos, cremas y pomadas, productos derivados de sangre o plasma humano, etc.).

En el caso de los procesos de fabricación de medicamentos de Terapias Avanzadas, los anexos que le son de aplicación son:

- Anexo 1: Fabricación de medicamentos estériles.
- Anexo 2: Fabricación de sustancias activas biológicas y medicamentos biológicos para uso humano.
- Anexo 8: Toma de muestras de materiales de partida y de almacenamiento.
- Anexo 11: Sistemas informatizados.
- Anexo 13: Fabricación de medicamentos en investigación.
- Anexo 15: Cualificación y validación.
- Anexo 16: Certificación por la persona cualificada y liberación de lote.
- Anexo 17: Liberación paramétrica.
- Anexo 18: Normas de Correcta Fabricación de sustancias activas (este anexo se encuentra recogido como Parte II de la Guía de NCF).
- Anexo 19: Muestras de referencia y muestras de retención.

Las revisiones periódicas de las NCF se publican en la página web de la Comisión Europea (http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm) así como en la web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (<https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/home.htm>).

Como la evaluación de los productos de Terapias Avanzadas a menudo requería un conocimiento experto que iba más allá del ámbito farmacéutico tradicional y abarcaba zonas limítrofes con otros sectores como la biotecnología y los dispositivos médicos, se creó en el año 2007 el Comité para Terapias Avanzadas (CAT), dependiente de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), constituido por un equipo multidisciplinario que reúne a algunos de los mejores expertos de Europa. El CAT es el responsable de preparar un proyecto de dictamen sobre la calidad, seguridad y eficacia de cada

medicamento de Terapia Avanzada para su aprobación final por parte del Comité de Productos Medicinales de Uso Humano (*Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP*).

1.2.2. Normas de Buena Práctica Clínica. consideraciones sobre medicamentos en investigación para uso humano y ensayos clínicos con medicamentos.

Un medicamento en investigación es la forma farmacéutica de un principio activo o un placebo cuya seguridad y eficacia se investiga o se utiliza como referencia en un ensayo clínico, incluyendo un producto con autorización de comercialización cuando se utilice o forme parte (en la formulación o en el acondicionamiento) de un medicamento en una forma distinta a la autorizada, o cuando se utilice para una indicación no autorizada, o para obtener más información sobre un uso autorizado [21].

La aplicación de las NCF a la fabricación de medicamentos en investigación tiene la finalidad de asegurar que los sujetos del ensayo no se expongan a riesgos y que los resultados de los ensayos clínicos no se vean afectados por una seguridad, calidad o eficacia insuficientes, derivadas de una fabricación inadecuada. Igualmente tiene la finalidad de garantizar que exista consistencia entre lotes del mismo medicamento en investigación utilizado en el mismo o en diferentes ensayos clínicos y que los cambios durante el desarrollo de un medicamento en investigación estén suficientemente documentados y justificados.

La Buena Práctica Clínica (BPC) es un término acuñado en Estados Unidos (*Good Clinical Practice, GCP*) que engloba una serie de normas dirigidas a garantizar los derechos de los sujetos que participan en un ensayo clínico, asegurar la calidad de los datos, y evitar errores en la investigación clínica. Además, protege a los sujetos que participan en un ensayo clínico, a los futuros sujetos que participarán en un ensayo, y a todas las personas que son tratadas con medicamentos cuya autorización se fundamenta en los resultados obtenidos en los estudios presentados en las agencias reguladoras para el registro del medicamento.

La BPC incluye principios éticos y derechos conseguidos a lo largo de la historia (Código de Nuremberg [22], Informe Belmont [23], Declaración de Helsinki [24]). En 1995, en la Conferencia Internacional de Armonización (*International Conference on Harmonisation, ICH*), la Unión Europea junto con Japón y Estados Unidos consiguió llegar a consensuar una guía común de normas de BPC que deben cumplir los ensayos clínicos que se presenten como base para la autorización de medicamentos en dichas áreas geográficas. Este documento de consenso, titulado Normas de Buena Práctica Clínica (*Note for Guidance on Good Clinical Practice, CPMP/ICH/135/95*), fue aprobado en 1996 por el CHMP dependiente de la EMA y entró en vigor en 1997 [25].

De acuerdo con dicho documento, la BPC se define como una norma internacional de calidad científica y ética dirigida al diseño, registro y redacción de informes de los ensayos clínicos en los que participan seres humanos. El cumplimiento de estas normas

garantiza públicamente la protección de los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos que participan en el estudio y asegura la integridad y credibilidad de los datos obtenidos en un ensayo clínico.

La Directiva Europea 2001/20/CE [26] estableció las bases legales y administrativas para la aplicación de las normas de BPC en los ensayos clínicos con medicamentos realizados en Europa. Esta Directiva ha sido transpuesta en España mediante el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero [27], que regula los ensayos clínicos con medicamentos, modificado por el Real Decreto 1345/2007 [28] y por el Real Decreto 824/2010 [29].

La Directiva 2005/28/EC [30] establece los principios y directrices detalladas de las normas de BPC respecto a los medicamentos en investigación de uso humano, así como los requisitos para autorizar la fabricación o importación de dichos medicamentos. Esta directiva ha sido transpuesta en España por medio de la Orden SCO/256/2007 de 5 de febrero [31], modificada por la Orden SCO/362/2008 [32].

Los ensayos clínicos en los que se basa la autorización de comercialización de los medicamentos en Europa deben seguir las normas de BPC de acuerdo con la Directiva 2004/27/EC transpuesta en España mediante el Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre, que regula la autorización, registro y dispensación de los medicamentos de uso humano.

Los participantes en un ensayo clínico deben tener en cuenta no solo las normas de BPC sino también las directrices científicas sobre calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano adoptadas por el CHMP y publicadas por la EMA, así como las demás directrices farmacéuticas comunitarias publicadas por la Comisión Europea en los distintos volúmenes de las Normas sobre Medicamentos en la Unión Europea.

1.3. FABRICACIÓN ASÉPTICA DE MEDICAMENTOS ESTÉRILES

La Esterilidad se define como la ausencia de organismos vivos. Existen dos grandes grupos de medicamentos que deben ser estériles: aquellos preparados que van a ser administrados por vía parenteral o aquellos que van a estar en contacto directo con las mucosas, como los medicamentos oftalmológicos.

Aunque los incidentes confirmados relativos a la contaminación de productos parenterales y oftalmológicos son raros, entre 1970 y 1971 el incidente de Rocky Mount en Carolina del Norte, U.S. provocó 40 muertes por la infusión de un fluido por vía intravenosa contaminado por *Enterobacter cloacae*, *Enterobaccter agglomerans* y otras especies de *Enterobacter* [33]. Entre 1972 y 1973 el incidente Davenport en U.K. causó la muerte de 5 pacientes de postoperatorio que fueron tratados con infusiones de dextrosa no estéril contaminadas por *Klebsiella aerogenes* (Clothier Report, 1972). En el mismo año, el incidente en Chattanooga en Estados Unidos causó la muerte de 3 pacientes. Más recientemente, en España se describieron 46 casos de septicemia

causados por *Burkholderia (Pseudomonas) pickettii* tras la administración de inyecciones de ranitidina que fueron envasadas de forma aséptica [34].

Entre 2012 y 2013 se produjeron, en Estados Unidos, 749 casos de infecciones por hongos, así como 61 muertes tras la administración epidural de 3 lotes de metilprednisolona contaminados por hongos. Los líquidos cefalorraquídeos de los pacientes presentaron el mismo hongo que el encontrado en el inyectable [35].

Desde el momento en que un producto es administrado por vía parenteral, la rotura de la barrera protectora natural hace que, cualquier microorganismo, incluso los comúnmente conocidos como “no patógenos” sean susceptibles de causar un riesgo para la salud y la seguridad del paciente.

Los productos de Terapia Celular Somática son considerados medicamentos estériles. Son productos biológicos no susceptibles de esterilización terminal mediante las técnicas descritas en la Farmacopea Europea (esterilización por vapor, calor seco, radiaciones ionizantes u óxido de etileno) [36] y tampoco pueden ser sometidos a filtración antes de su envasado final. Por ello, todo su proceso de fabricación debe realizarse en condiciones extremas de asepsia.

En la fabricación de medicamentos estériles, la esterilización terminal usualmente implica que el llenado y sellado previo de los contenedores de medicamento se realice bajo condiciones de alta calidad ambiental para minimizar el contenido microbiano y de partículas del producto, ayudando así a asegurar que el proceso de esterilización posterior es exitoso. En la mayoría de casos, tanto el producto como el contenedor, tienen una baja carga biológica, pero no pueden considerarse estériles, por lo que el producto, en su recipiente final, se somete a un proceso de esterilización.

En cambio, en el proceso de fabricación aséptica, el producto medicinal y el contenedor se someten primero, y por separado, a un proceso de esterilización (apropiado para cada uno de ellos) para posteriormente introducir el producto en el contenedor. Dado que en estos casos no existe un método para esterilizar el producto en su contenedor final, es de importancia crítica que los contenedores se llenen y sellen en un ambiente de calidad extrema. El procesado aséptico implica que todas las partes del producto final han de ser estériles o fabricadas de forma aséptica. Cada subproceso supone por tanto un riesgo de contaminación que finalmente puede afectar a la esterilidad del producto terminado y por ello se precisa un cuidadoso control, necesitando que todas las operaciones de producción deban estar validadas y sometidas a estrictas medidas de control.

Debido a su naturaleza, los productos de Terapia Celular se procesan asépticamente desde las primeras etapas de su fabricación. En estos casos, todos los componentes (como materiales fungibles y medios de cultivo celular) y excipientes (medios utilizados para el acondicionamiento del producto terminado) utilizados en alguna de las fases de proceso productivo deben ser estériles y, la liberación del producto final se realiza según el resultado de un ensayo de esterilidad en el producto terminado.

1.4. INSTALACIONES PARA LA FABRICACIÓN ASÉPTICA DE MEDICAMENTOS

1.4.1. Generalidades

Según el Anexo 1 de las NCF, la fabricación de productos estériles ha de fabricarse en "zonas limpias", "salas blancas" o "salas GMP", es decir, en instalaciones de ambiente controlado especialmente diseñadas para obtener bajos niveles de contaminación.

Esto se logra mediante el control estricto de una serie de parámetros tales como los niveles de partículas en aire, presión diferencial, temperatura, humedad relativa, o flujos de aire. Este tipo de instalaciones son ampliamente utilizadas por diferentes sectores tales como la industria aeroespacial, microelectrónica y farmacéutica, entre otros [37] y el nivel de limpieza del aire exigido varía según el uso al que se destinan.

Para conseguir esos bajos niveles de contaminación se establecen una serie de parámetros y sistemas de seguridad:

- los materiales utilizados en la construcción de suelos, paredes, techos y equipos de climatización deben estar diseñados, contruidos, instalados y cualificados con el fin de mantener los niveles de limpieza de aire preestablecidos y según las especificaciones técnicas de la instalación.
- las instalaciones han de ser de tamaño adecuado y los materiales utilizados en su construcción deben permitir una adecuada limpieza y desinfección. El espacio para colocar los materiales y equipos ha de ser suficiente para evitar contaminaciones cruzadas y prevenir la contaminación microbiana.
- el aire introducido en la sala ha de ser estéril, filtrado mediante filtros de alta eficacia (ULPA o HEPA) para eliminar partículas en suspensión y microorganismos. Además, el sistema de climatización debe estar diseñado para renovar el aire de la instalación varias veces por hora para eliminar las partículas generadas.
- las salas se mantienen con una cascada de presión positiva con respecto al exterior mediante sistema de esclusas, a partir de la relación de aire impulsado en cada sala a través de los filtros HEPA terminales y el aire que es extraído mediante los retornos (además de las posibles pérdidas de la instalación). Ello permite que, al abrir las puertas el aire salga desde las salas de mayor clasificación hacia el exterior, y no al revés.
- los flujos de materiales, personal, sustancias activas, productos terminados y residuos a través de la instalación han de diseñarse e implantarse con el fin de prever la contaminación.
- Los equipos y utensilios deben limpiarse, mantenerse y desinfectarse periódicamente con fin de prever un malfuncionamiento o contaminación que

pueda afectar a la seguridad, identidad, potencia, calidad y pureza del medicamento [38].

1.4.2. Grados de clasificación ambiental

Dependiendo de la criticidad del proceso de fabricación a realizar, se establecen unos requisitos de limpieza de aire, medida según el número de partículas en suspensión en dos estados diferentes, “en reposo” y “en funcionamiento”. La situación “en reposo” es aquella en que la sala o habitación se encuentra completa y operativa, con los equipos de producción instalados, pero sin que esté presente el personal. La situación “en funcionamiento” es aquella en la que la instalación está funcionando en la forma definida y con el número de personas establecidas realizando sus tareas habituales [39].

1.4.2.a. Consideraciones acerca de las partículas transportadas por aire

Se define partícula, a los efectos de clasificación de la limpieza de aire, a las partes sólidas o líquidas que en un conjunto de distribución se mueven entre el tamaño crítico (límite inferior) de 0,1 μm y 5 μm . El tamaño de una partícula equivale a su diámetro [40] y, en función del mismo, las partículas se clasifican en ultrafinas (con un diámetro equivalente inferior a 0,1 μm), macropartículas (con un diámetro equivalente mayor de 5 μm) y fibras (con una relación entre longitud y anchura ≥ 10) (figura 1). Las partículas en el rango de 0,1 μm a 5 μm son las utilizadas para determinar el grado de clasificación ambiental en este tipo de instalaciones en el ámbito de aplicación de la norma ISO 14644.

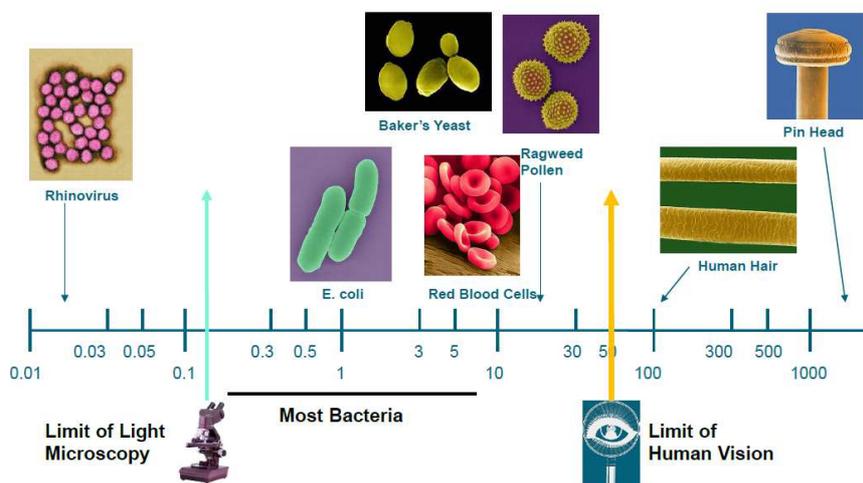


Figura 1. Diferentes tipos de partículas clasificadas en función de su diámetro

Todas estas partículas pueden clasificarse a su vez en partículas viables (partículas que consisten en, o soportan, uno o más microorganismos vivos) [2] o no viables o inertes (aquellas que no consisten ni transportan microorganismos viables).

Los límites tanto de partículas totales como de partículas viables se establecen en el anexo 1 de las NCF y dependen de la operación de fabricación a realizar.

1.4.2.b. Grados de clasificación ambiental definidos en las NCF

Para la fabricación aséptica de medicamentos se distinguen cuatro grados de clasificación ambiental [39]:

- *Grado A*: zona donde se realizan operaciones de alto riesgo tales como la preparación aséptica y el llenado. Normalmente estas condiciones son provistas por estaciones de trabajo de flujo laminar.

Los sistemas de flujo laminar deben proporcionar una velocidad homogénea del aire impulsado en un intervalo de 0,36-0,54 m/s (orientativo) a nivel del punto de trabajo en entorno abierto. Debe demostrarse y validarse el mantenimiento de la laminaridad. Se puede utilizar un flujo de aire unidireccional y velocidades más bajas en aisladores cerrados y con guantes.

- *Grado B*: entorno para la zona de grado A en el caso de preparación y llenado asépticos.
- *Grados C y D*: zonas limpias para realizar fases menos críticas de la fabricación de productos estériles.

Aunque las NCF establecen cuatro grados de clasificación (A, B, C y D) basados en los tamaños de partícula de 0,5 μm y 5 μm (Tabla 1), éstos son tomados según lo establecido en la norma UNE-EN-ISO 14644-1 “Salas limpias y locales anexos. Clasificación de la limpieza del aire” [40] (Tabla 2), norma de referencia para el diseño, construcción, y cualificación de este tipo de instalaciones.

Grado	Número máximo de partículas de tamaño igual o superior al indicado en la tabla permitido por m^3			
	En reposo		En funcionamiento	
	0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Sin definir	Sin definir

Tabla 1. Grados de clasificación ambiental establecidos en las NCF en función del número de partículas/ m^3 de aire de los tamaños de $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y $\geq 5 \mu\text{m}$.

Número de clasificación ISO	Límites máximos de concentración de partículas (número de partículas/ m^3 de aire)					
	$\geq 0,1 \mu\text{m}$	$\geq 0,2 \mu\text{m}$	$\geq 0,3 \mu\text{m}$	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$
ISO Clase 1	10	2				
ISO Clase 2	100	24	10	4		
ISO Clase 3	1.000	237	102	35	8	
ISO Clase 4	10.000	2.370	1.020	352	83	
ISO Clase 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO Clase 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO Clase 7				352.000	83.200	2.930
ISO Clase 8				3.520.000	832.000	29.300
ISO Clase 9				35.200.000	8.320.000	293.000

Tabla 2. Límites de las Clases del Estándar ISO 14644-1.

Introducción

Para el grado A, la clasificación de partículas del aire es la ISO 4.8, determinado por el límite de tamaño de partícula 5 μm .

Para el grado B (en reposo), la clasificación de partículas del aire es la ISO 5 para los dos tamaños de partículas considerados.

Para el grado C (en reposo y en funcionamiento), la clasificación de partículas del aire es la ISO 7 y la ISO 8, respectivamente.

Para el grado D (en reposo), la clasificación de partículas del aire es la ISO 8.

En la tabla 3 se muestra la correlación entre los grados ambientales establecidos en las NCF y la norma ISO 14644-1:1999 según el número máximo de partículas de tamaño \geq al indicado en la tabla permitido por m^3 de aire.

Clase ISO	NCF	En reposo		En funcionamiento	
		0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm
ISO 4.8	A	3.520	20	3.520	20
ISO 5	B	3.520	29	352.000	2.900
ISO 7	C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
ISO 8	D	3.520.000	29.000	Sin definir	Sin definir

Tabla 3: Correlación entre las clases ambientales de la norma ISO 14644-1 y los grados ambientales de las NCF.

A fin de cumplir las condiciones “en funcionamiento”, una sala blanca debe diseñarse de forma que alcance ciertos niveles específicos de limpieza de aire “en reposo”. Estas condiciones se generan mediante un sistema de ventilación, calefacción y aire acondicionado comúnmente llamado climatizador o sistema HVAC (Heating, Ventilating and Air Conditioning).

1.4.3. Sistema HVAC

La finalidad de un sistema HVAC es proporcionar un flujo de aire acondicionado a través de una serie de filtros, de manera que se retengan las partículas aerotransportadas en la cantidad necesaria para que las mediciones de las mismas realizadas en el interior del área clasificada cumplan con los límites establecidos en las NCF.

Un sistema HVAC está formado por generadores e impulsores de aire (climatizadores), una enfriadora encargada de mantener las especificaciones de temperatura y humedad preestablecidas y una serie de filtros y prefiltros encargados de eliminar las partículas presentes (figura 2). Además, posee una serie de conductos, retornos y sensores que, controlados por una centralita, generan y mantienen la atmosfera necesaria según las necesidades de clasificación ambiental de cada habitación (figura 3).



Figura 2. Climatizadores y enfriadora del sistema HVAC de la Unidad de Producción Celular del HRU de Málaga

De esta forma, se genera el ambiente en el interior de la instalación necesario para la fabricación aséptica de medicamentos basados en Terapias Avanzadas según NCF: el grado A necesario se consigue habitualmente mediante el uso de cabinas de flujo laminar (dónde el producto queda expuesto al medio ambiente) ubicadas en habitaciones de grado B. Los filtros HEPA terminales y luminarias se encuentran ubicados en el techo y los retornos de aire en las paredes, cerca del suelo.

Para alcanzar los grados B, C y D, el número de renovaciones de aire dependerá del tamaño de la sala, así como del equipamiento y el personal presentes en la sala. El sistema de aireación debe estar equipado con filtros apropiados, como los filtros HEPA para los grados A, B y C.

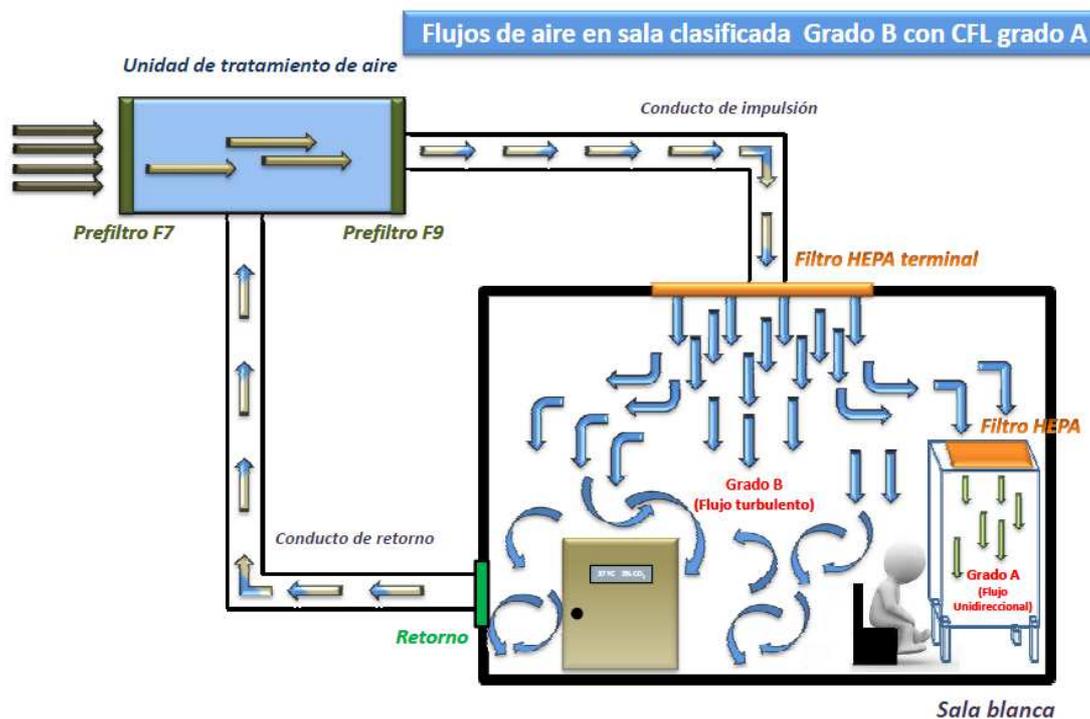


Figura 3. Esquema de flujo de aire en una sala GMP. Fuente: elaboración propia.

1.4.3.a. Cualificación de instalaciones de ambiente clasificado.

El adecuado funcionamiento del sistema HVAC y, por tanto, el adecuado mantenimiento de las características ambientales establecidas en las NCF para la fabricación aséptica de medicamentos han de ser cualificado periódicamente.

Según la norma ISO 14644-2:2000 [41], donde se establecen las especificaciones para los ensayos y el control para verificar el cumplimiento continuo de la norma ISO 14644-1:1999, es requisito indispensable la determinación del grado de la clasificación de aire de cada ambiente con un intervalo máximo de 6 meses en las zonas clasificadas como ISO 5 o inferior y, con un intervalo máximo de 12 meses en las zonas clasificadas con grado superior a ISO 5, utilizando para ello un contador óptico de partículas.

La recualificación de la instalación deberá repetirse, además, tras alguna de las siguientes actuaciones:

- A la finalización de una acción encaminada a reparar algún elemento por no cumplir los criterios de aceptación en una anterior calificación.
- Al realizar un cambio significativo en las especificaciones de funcionamiento.
- Ante cualquier interrupción relevante del movimiento del aire que afecte al funcionamiento de la instalación. Normalmente este hecho ocurre cuando el sistema HVAC sufre una parada prolongada.
- Tras un mantenimiento especial que influya de manera importante en el funcionamiento de la instalación (por ejemplo, cambio de filtros terminales)

Esta norma establece, además, que donde la aplicación lo requiera, se realizarán otros ensayos adicionales como son el “volumen de aire o velocidad” y la “presión diferencial en el aire” (ambos con un intervalo máximo de tiempo de 12 meses). En el caso de la fabricación de medicamentos estériles según NCF, la presión diferencial es objeto de control normativo, por lo que estos ensayos deberán estar incluidos en los trabajos de cualificación.

Habitualmente, este tipo de trabajos de cualificación son subcontratados a empresas del sector industrial y se encuentran descritos y regulados en la parte 3 de la norma ISO 14644. Las pruebas a realizar en este tipo de instalaciones (aunque puedan realizarse otras adicionales) son:

1.4.3.a.1. Test de integridad de filtros

Mediante este ensayo se pretende confirmar que los filtros terminales HEPA están correctamente instalados verificando la ausencia de fugas de derivación en la instalación (adecuada colocación de los filtros) y la ausencia de defectos y de fugas en los filtros y en la estructura de montaje (figura 4).

Para ello, se genera un aerosol (con una concentración conocida de partículas) que se introduce en los conductos antes del filtro y con un contador de partículas o un

Introducción

fotómetro de aerosol se determina la cantidad de partículas que no son retenidas por el filtro.

Se estima que un filtro HEPA terminal deja pasar menos del 0,01 % de las partículas presentes “aguas arriba”.



Figura 4. Test de integridad de filtros. Fuente: elaboración propia.

1.4.3.a.2. Verificación del caudal de aire y renovaciones de aire

El objeto de este ensayo es medir la velocidad y uniformidad del flujo de aire y del caudal de aire impulsado, habitualmente utilizando un anemómetro o un caudalímetro (figura 5). Las mediciones de la distribución de la velocidad son necesarias en salas y zonas limpias con flujo de aire unidireccional (mediante anemómetro), y las del caudal de aire impulsado en salas y zonas limpias con flujo de aire no unidireccional o turbulento (mediante caudalímetro).



Figura 5. Anemómetro y caudalímetro para determinación de caudal y renovaciones de aire.

Introducción

El caudal de aire impulsado por cada filtro es usado para conocer el volumen total de aire impulsado y para calcular las renovaciones de aire por unidad de tiempo.

En el caso de instalaciones con flujo de aire unidireccional, el caudal es el producto de la velocidad del aire y de la superficie del filtro.

1.4.3.a.3. Contaje de partículas

Se realiza para conocer la concentración de partículas contenidas en el aire de una determinada instalación y sus salas mediante un contador óptico de partículas (figura 6). El número de puntos de toma de muestras, la elección de su situación, la clasificación de la zona según los resultados obtenidos y la cantidad de datos requeridos quedan establecidos en la norma ISO 14644-1.



Figura 6. Contador óptico de partículas

1.4.3.a.4. Test de recuperación de clase

Se realiza con el fin de obtener la capacidad de la instalación para eliminar las partículas en suspensión en el aire. La capacidad de recuperación de la limpieza después de una generación de partículas constituye una de las funciones más importantes de la instalación.

Este ensayo solo es importante y recomendable para las instalaciones de flujo de aire no unidireccional o turbulento ya que la capacidad de recuperación depende de la relación de recirculación de aire, de la geometría de las entradas y salidas de aire, de las condiciones térmicas y de las características de distribución del aire en el interior de la zona. En un sistema de flujo unidireccional la contaminación se desplaza con el flujo de aire y el tiempo de recuperación es función de la velocidad de impulsión y la distancia recorrida.

1.4.3.a.5. Determinación de la presión diferencial

Tiene como objeto verificar la capacidad de la instalación para mantener la diferencia de presión especificada entre la instalación y el ambiente que la rodea y entre los diferentes espacios separados en el interior de la instalación.

Es conveniente confirmar que los caudales de impulsión y retorno de aire están de acuerdo con las especificaciones establecidas antes de comenzar con las mediciones de presión.

Los criterios de aceptación para la fabricación aséptica de medicamentos se recogen en el anexo 1 de las NCF, estableciendo que, las salas adyacentes de grados diferentes deben tener un gradiente de presión de 10-15 pascales.

1.4.3.a.6. Verificación de la temperatura y humedad relativa

Con el ensayo de verificación de temperatura, se pretende comprobar la capacidad del sistema de tratamiento de aire de la instalación para mantener el nivel de temperatura del aire dentro de los límites establecidos por el usuario. Las sondas de medición se deben colocar a la altura de trabajo y el tiempo de medición debe ser como mínimo 5 minutos, registrando, al menos, un valor cada minuto.

Mediante el ensayo de humedad relativa se comprueba la capacidad de la instalación para mantener el nivel de humedad del aire (expresado en humedad relativa o punto de rocío) dentro de los márgenes establecidos. La colocación de las sondas e intervalos de medición son los mismos que los establecidos para el ensayo de temperatura.

1.4.4. Normas de vestuario y comportamiento en zonas de ambiente controlado

Debido a las especiales características de los materiales utilizados en la fabricación de este tipo de instalaciones, si el sistema HVAC es de la calidad suficiente para generar y mantener el ambiente deseado y el equipamiento introducido en la sala es especialmente elegido por su escasa o nula capacidad de liberación de partículas, el mayor riesgo de contaminación proviene del personal que realiza operaciones en el interior del área clasificada.

Por ello es fundamental que se implanten los adecuados procedimientos de higiene, vestuario y entrada del personal, así como la aseptización de materiales utilizados en el interior de las zonas clasificadas. Especialmente importante es la formación adecuada de todo el personal que realice alguna actividad en las zonas de ambiente controlado. Las actividades, especialmente cuando se estén realizando operaciones asépticas, deberán mantenerse a un nivel mínimo y el movimiento de personal deberá ser controlado y metódico, para evitar la liberación excesiva de partículas y microorganismos debido a movimientos excesivamente enérgicos.

1.4.4.a. La piel humana como principal fuente de biocontaminación en salas clasificadas

La piel humana alberga una amplia variedad de microorganismos y su composición puede variar en respuesta a diferentes estímulos ambientales como puede ser la temperatura, humedad, pH y probablemente la inhibición o estimulación por otros microorganismos presentes de forma habitual [42].

La principal vía de introducción de partículas a un área de ambiente controlado proviene del personal que realiza sus funciones en esta área, concretamente por la dispersión de partículas procedentes de la descamación de la piel humana. Este hecho, ampliamente aceptado, fue descrito por primera vez por W.C. Noble en 1961 [43] [44] [45]. Algunas personas parecen tener una especial habilidad para diseminar partículas de descamación, de hecho, los varones dispersan entre 2,5 a 5 veces más partículas viables que las mujeres [43] y, curiosamente, los varones jóvenes y sanos son significativamente mayores dispersores de *Staphylococcus aureus* que las mujeres. En ocasiones este hecho puede estar relacionado con que habitualmente un varón suele tener mayor superficie corporal que una mujer de su mismo peso.

Las zonas corporales de mayor descamación y dispersión de microorganismos, en general, parecen ser de cintura hacia abajo, más que de cintura hacia arriba [46]. Proporcionalmente, la ingle es la mayor fuente de partículas viables cuando se comparan diferentes zonas del cuerpo [47].

Existen diferencias en cuanto a la cantidad de microorganismos presentes en diferentes zonas corporales entre hombres y mujeres (tabla 4), ya que, a excepción de la nariz, los hombres tienen recuentos de microorganismos más elevados en localizaciones anatómicas tales como muslos, espinilla, abdomen, brazo, pecho, espalda, axila y perineo:

Method of sampling (area sampled)	Site	Mean count* for		Statistical significance (t test)
		males (n = 38)	females (n = 34)	
Scrub count (4 cm ²)	Thigh	10 470	1230	P<0.1%
	Abdomen	2344	646	P<1%
	Shin	2455	692	P<1%
	Arm	549	389	NS
	Chest	3890	741	P<1%
	Back	468	309	NS
Contact plate (25 cm ²)	Hair	324	81	P<0.1%
	Thigh	873	220	P<0.1%
	Shin	549	234	P<5%
	Arm	178	109	NS
	Chest	263	126	P<5%
	Abdomen	162	107	NS
	Back	55	48	NS
Alginate swab (not defined)	Axilla	147 900	53 700	NS
	Nose	19 500	30 200	NS
	Perineum	275 400	186 200	NS

Tabla 4. Recuento total de microorganismos en varias zonas del cuerpo en hombres y mujeres. *Medias aritméticas. Análisis de significación realizado sobre valores logarítmicos (tomado de Noble [43])

En cuanto a las mujeres, parece que, aunque las espinillas no son la zona con mayor población microbiana, si son una fuente importante de dispersión de partículas viables. Esto posiblemente es debido al efecto de cizallamiento que pueden ejercer las medias [48].

Noble en 1962, definió el término “dispersador” (de *Staphylococcus aureus* en este caso) como aquella persona capaz de diseminar este microorganismo en una cantidad mayor al 1% del total de los microorganismos diseminados mientras realiza alguna actividad, en este caso al desnudarse. Bethune y cols. en 1965 describió como “dispersador” a aquella persona capaz de diseminar más de 10 partículas que transportaran a este microorganismo en una habitación de 2,83 m³ de volumen durante la realización de ejercicio físico [49]. Aunque ambos conceptos, en la práctica, se encuentran sorprendentemente cercanos, está claro que existe un amplio espectro de dispersión y que cualquier cut-off usado para definir a un “dispersador” y que se base en un microorganismo específico resulta arbitraria [50].

En definitiva, la realidad es que todos los seres humanos nos comportamos de una u otra forma como “dispersadores” o diseminadores de nuestra propia microbiota saprofita de la superficie corporal. Por ello, cualquier microorganismo capaz de sobrevivir en la superficie de la piel, puede ser dispersado como resultado de la descamación de la misma.

Muchas de las bacterias liberadas por la piel humana son producto de la descamación producida por el efecto abrasivo de los tejidos que forman la vestimenta [51], en los que penetran y desde los que son posteriormente liberados [52]. Estas partículas son dispersadas en el flujo de aire caliente alrededor del cuerpo y la posterior acción de frotamiento de la ropa [53].

1.4.4.b. Medidas para controlar y minimizar el efecto de las partículas de descamación

1.4.4.b.1. Baño corporal

Las bacterias que forman el hábitat normal de la piel humana viven en las capas externas queratinizadas de la epidermis y se sabe que el baño con agua puede eliminar muchas de estas capas exteriores de la piel (figura 7).

Los recuentos bacterianos de aerobios totales disminuyen inmediatamente tras el lavado con agua caliente y jabón, recuperando sus valores aproximadamente 24 horas después. El agua caliente por sí sola es menos efectiva que si se usa conjuntamente con jabón. Este efecto puede verse disminuido al dispersar, mediante el frote excesivo de la piel, numerosos clusters bacterianos a otras zonas epidérmicas [54] e incluso algunos estudios señalan un aumento en la dispersión de *Staphylococcus aureus* tras el baño [49].

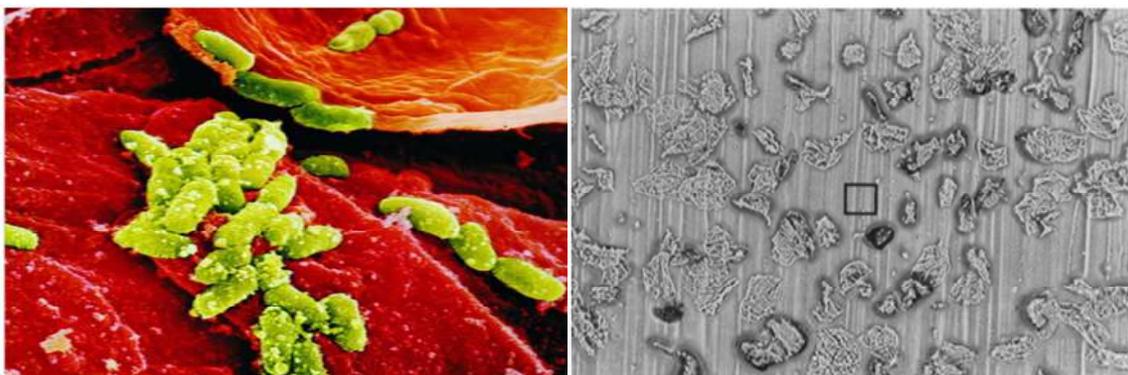


Figura 7. Fragmentos de piel. Izquierda: Micrografía de Barrido. Derecha: Micrografía electrónica (66x) [47].

La aplicación de una emulsión de aceite en agua demostró una reducción significativa en el número de bacterias y partículas descamadas por la piel cuando se comparaba con la descamación que acontece tras el baño. Por tanto, la hidratación de la piel con un aceite o loción corporal puede reducir la descamación y posterior dispersión de partículas y provee una simple y barata alternativa para reducir la contaminación ambiental mediada por el ser humano [55].

1.4.4.b.2. Vestimenta

Otra de las formas de controlar la biocontaminación por microbiota cutánea es el uso de trajes especialmente diseñados a base de costuras muy juntas para retener las partículas de descamación liberadas por la piel [46] [56]. Estas prendas reducen significativamente la dispersión de microorganismos y son útiles especialmente cuando los microorganismos no patógenos pueden resultar peligrosos o no deseables [43]. Sin embargo, no todos los tejidos ejercen igual función ya que los trajes especiales fabricados en algodón no reducen la dispersión de partículas mientras que los compuestos por un 65% de polyester y un 35% de algodón muestran reducciones de entre el 50 y 75% en el número de partículas viables liberadas. Además, la combinación de este traje de polyester con unas botas de caña alta o polainas reducen aún más la dispersión [57]. Por lo general, se utiliza un traje interior reutilizable de dos piezas con elástico ajustable en muñecas y tobillos fabricado en polyester y algodón.. Por encima de éste, se sitúa un mono desechable, de una sola pieza, con elásticos en muñecas y tobillos, y capucha incorporada o independiente.

El Institute of Environmental Sciences and Technology (IEST) es una asociación sin ánimo de lucro que reúne a expertos mundiales reconocidos por sus contribuciones al desarrollo de las ciencias medioambientales. Esta institución ha recogido en su documento técnico IEST-RP-CC003 [58] las recomendaciones acerca de la vestimenta a utilizar en cada tipo de sala con el fin de limitar la contaminación generada por la presencia humana (tabla 5).

Garment system configurations for different classes of air cleanliness.								
Apparel Type	Air Cleanliness Classes of ISO 14644-1:1999 ¹							
	ISO Class 8	ISO Class 7	ISO Class 6	ISO Class 5	ISO Class 5 Aseptic	ISO Class 4	ISO Class 3	ISO Class 1, ISO Class 2
Inner Suit	AS	AS	AS	R	AS	R	R	R
Hair Cover (Bouffant)	R	R	R	R	R	R	R	AS
Woven Gloves	AS	AS	AS	AS	NR	NR	NR	NR
Barrier Gloves	AS	AS	AS	AS	R	R	R	R
Facial Cover	AS	AS	AS	R	R	R	R	AS
Hood	AS	AS	AS	R	R	R	R	AS
Powered Headgear	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	R
Frock	R	R	AS	AS	NR	NR	NR	NR
Coverall	AS	AS	R	R	R	R	R	R
Two-Piece Suit	AS	AS	AS	AS	NR	NR	NR	NR
Shoe Cover	R	R	AS	AS	NR	NR	NR	NR
Boot	AS	AS	R	R	R	R	R	R
Special Footwear	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS
Suggested Frequency of Change ²	2x/week	2x/week	3x/week	1x/day	Per Entry	Per Entry	Per Entry	Per Entry

¹ For correlation of ISO air cleanliness classes to the former FED-STD-209 classes, refer to Table 1 in this document.
² Consideration should be given to the effects of seasonal conditions in some geographical areas. Note that the suggestions made are not based on scientific data but instead reflect the collective experience offered by the working group. Individual requirements for change frequency should be determined on a case-by-case basis.
R = Recommended
NR = Not Recommended
AS = Application Specific

Tabla 5. Recomendaciones de la IEST acerca de la vestimenta a utilizar en zonas de ambiente clasificado.

De forma similar, las NCF establecen, en su Anexo 1, la indumentaria mínima que se ha de llevar en determinadas zonas dedicadas a la fabricación aséptica de medicamentos:

- Grado D: Debe quedar cubierto el cabello y, en su caso, la barba. Se ha de utilizar un traje protector general y zapatos o cubrezapatos adecuados. Han de tomarse medidas para evitar la entrada en la zona limpia de contaminación procedente del exterior.
- Grado C: ha de quedar cubierto el cabello, y en su caso, la barba y el bigote. Se debe usar un traje de pantalón de una o dos piezas, recogido en las muñecas y con cuello alto, junto con zapatos o cubrezapatos adecuados. Esta ropa no debe liberar prácticamente ninguna fibra ni partícula.
- Grado A/B: El cabello y, en su caso, la barba y el bigote han de cubrirse totalmente con un tocado que se introducirá en el cuello del traje; debe utilizarse una máscara para evitar la emisión de gotitas. Se usarán guantes apropiados esterilizados de goma o plástico, sin polvos de talco, y se llevará calzado estéril o desinfectado. Las partes inferiores de los pantalones se introducirán en el calzado y las mangas en

Introducción

los guantes. La vestimenta protectora no debe liberar prácticamente ninguna fibra ni partícula y debe retener las partículas desprendidas por el cuerpo.

La vestimenta de exterior no debe introducirse en los Vestuarios que llevan a las salas de grado B y C. Cada trabajador de las áreas de grado A/B ha de utilizar vestimenta protectora limpia y estéril (esterilizada o desinfectada de forma adecuada) en cada sesión de trabajo. Los guantes se desinfectarán periódicamente durante la jornada de trabajo. Las máscaras y los guantes han de cambiarse, al menos, en cada sesión de trabajo.

La vestimenta de las zonas limpias se ha de lavar de forma que no acumule contaminantes adicionales que se puedan liberar posteriormente y, preferentemente, en instalaciones de lavandería independientes.

Las prendas utilizadas en las salas blancas deberían tener las siguientes características [59]:

- Liberar poca cantidad de partículas.
- Permitir la transpiración corporal mientras las partículas de descamación quedan retenidas. Estas partículas deben quedar retenidas en el traje y no ser liberadas al medio ambiente circundante.
- Ser suficientemente flexibles de forma que sean confortables.
- Aquellas que sean reutilizables, han de ser resistentes a repetidos ciclos de limpieza y esterilización.
- Han de cumplir requerimientos específicos tales como el control de carga electrostática.
- Han de ser coste-efectivos.

En cuanto a la forma de fabricar la ropa protectora podemos distinguir tres categorías:

- Prendas tejidas. Las prendas tejidas y reutilizables son ampliamente utilizadas en salas blancas. Estas prendas son tejidas en sofisticados telares que utilizan hilos de filamentos continuos de poliéster. El grosor del hilo y del filamento es muy importante, cuánto más finos sean, más tensas y cerradas serán las prendas y mejor será su capacidad de filtración de forma que se reduzca en lo posible el tamaño de los poros. Con el uso de poliéster de filamento continuo se reduce el número de cabos sueltos y se reduce el número de partículas emitidas.
- Tejidos laminados o de membrana. Los tejidos laminados son fabricados para algunos ambientes microelectrónicos de alto grado (ISO 4 o superior). Estos tipos de prendas de vestir no se utilizan comúnmente en el sector farmacéutico
- Prendas no tejidas de un solo uso: se trata de materiales fabricados a base de olefinas y polipropileno unidos por hilatura. Estas prendas han de ser

descontaminadas y esterilizadas (normalmente por gamma radiación) antes de ser utilizadas.

1.4.4.b.3. Lavado de manos

El lavado de manos es un procedimiento que normalmente se asume que es realizado adecuadamente, pero no debe menospreciarse cuando se incluye como parte integrante de un programa de control de la biocontaminación para la fabricación aséptica de medicamentos.

El uso de barras o pastillas de jabón de manos está totalmente desaconsejado ya que constituye un reservorio de microorganismos, incluyendo esporas, levaduras y hongos. Es recomendable que los jabones líquidos se utilicen en envases de un solo uso, mejor que aquellos dispensadores recargables ya que éstos pueden llegar a contaminarse y ser fuente de transmisión de microorganismos. En cuanto a aquellos jabones a los que se le adicionan aditivos antibacterianos, se ha comprobado que mejoran el efecto antibacteriano del jabón pero se ha de tener la precaución de seleccionar proveedores de prestigio reconocido pues que un jabón esté suplementado con un agente biocida no asegura que el producto en su conjunto tenga esta facultad [60].

Una de las operaciones que frecuentemente pasan desapercibidas es la recontaminación de las manos tras el lavado al manipular manualmente los grifos. Este problema es fácilmente subsanado si se utilizan grifos accionables con los codos o mediante pedales accionables con los pies. En este sentido, Griffith y cols. [61] mostraron una correlación entre la suciedad de estas superficies y la recontaminación de las manos, siendo los grifos la mayor fuente inminente de recontaminación. Se recomienda que los lavabos se localicen cerca de los puntos de entrada y que se encuentre jabón disponible.

Además, complementos tales como anillos, brazaletes y relojes deberían quitarse antes del lavado de manos ya que dificultan una adecuada limpieza. Para el secado de manos, se recomienda dejarlas al aire sin frotar; en caso de usar toallas se recomiendan de papel desechables. Si se utilizan secadores de aire, se recomienda aquellos con luz U.V. incorporada [62].

1.4.4.c. Comportamiento en el interior de zonas clasificadas

El comportamiento del personal que realiza sus actividades en el interior del área clasificada es de suma importancia para minimizar el impacto de su presencia en la calidad del aire de la instalación.

En un esfuerzo para conocer mejor el nivel de contaminación en salas blancas, Austin documentó y correlacionó los datos de emisión de partículas por el personal que desarrollaba sus actividades en salas blancas (tabla 6), estableciendo así el conocido Índice de Contaminación Austin [63]. Este índice nos da una idea de la cantidad de partículas liberadas por el ser humano, dependiendo del tipo de movimiento realizado y cómo el uso de ropa adecuada hace de filtro para evitar la dispersión de estas partículas

generadas. Incluso sin moverse, el ser humano emite gran cantidad de partículas de descamación de la piel. De hecho, el propio proceso de colocación del vestuario para evitar la dispersión de partículas es, en sí mismo, un proceso contaminante.

Índice de Contaminación de Austin			
Partículas >0,3 µm emitidas por minuto			
Actividad	Prendas tejidas	Traje protector total estándar	Traje protector total tipo Tyvek
Sin movimientos	100.000	10.000	1.000
Movimientos ligeros	500.000	50.000	5.000
Movimientos bruscos	1.000.000	100.000	10.000
Cambios de posición	2.500.000	250.000	25.000
Caminar lento	5.000.000	500.000	50.000
Caminar rápido	10.000.000	1.000.000	100.000

Tabla 6. Número de partículas >0,3 µm emitidas por minuto con los diferentes tipos de movimiento. (Tomado de *Encyclopedia of Clean Rooms, Bio-Clean rooms and Aseptic Areas*, Dr. Phillip Austin, PE, 2000).

Las partículas, debido a la carga electrostática propia de los tejidos, pueden quedar adheridas a la superficie de los trajes protectores y de alguna u otra forma, transportarse hacia zonas de mayor clasificación ambiental, o incluso, llegar a contaminar los productos fabricados. Incluso las propias partículas liberadas en clase B, pueden quedar adheridas a la superficie de guantes, antebrazos, hombros, etc., que posteriormente van a entrar en el interior de las cabinas de flujo laminar donde se van a manipular los productos estériles.

Por ello, la formación y el comportamiento del personal que realiza su actividad en la fabricación aséptica de medicamentos es vital para que todas las medidas protectoras y de control de la biocontaminación no se vean truncadas por factores tales como la fatiga y la desmotivación.

Los movimientos bruscos están totalmente desaconsejados en este tipo de instalaciones y deben respetarse adecuadas pautas de comportamiento tales como evitar limpiarse o frotarse las manos en la ropa protectora, tocarse la cara con las manos enguantadas; hablar (en exceso), cantar, silbar, toser, estornudar, etc., especialmente cuando se esté cerca de los productos o equipamiento.

El personal ha de estar sano. Enfermedades del tracto respiratorio superior y desórdenes gastrointestinales son un compromiso para la higiene. Se ha de controlar especialmente la entrada del personal con procesos infecciosos virales (gripes) o crisis asmáticas.

Obviamente, un factor importante a tener en cuenta es el número de personas que pueden estar al mismo tiempo en la sala desarrollando sus tareas con el fin de no elevar en exceso la cantidad de partículas en suspensión y colapsar la capacidad de auto limpieza de la sala (renovaciones de aire). Por este motivo, se desaconseja la coincidencia de personal durante los cambios de vestuario. El aforo máximo de cada

sala se ha considerar durante la planificación de la construcción de la misma, teniendo en cuenta el proceso que se quiere implantar y el personal necesario para realizarlo.

1.4.5. Mantenimiento del grado de clasificación ambiental

A pesar de la utilización de equipos de protección personal y vestimenta adecuados en este tipo de instalaciones, la dispersión de partículas a partir de los operarios es inevitable y han de implantarse medidas apropiadas que prevengan y retiren las partículas generadas por las tareas propias de fabricación.

En este sentido, la construcción de la instalación tiene importancia en cuatro aspectos físicos fundamentales para mantener las especificaciones de grado (renovaciones de aire, presión diferencial, humedad y temperatura) y que están directamente implicadas en el control de la biocontaminación ambiental.

1.4.5.a. Renovaciones de aire

Una de las barreras usadas para la eliminación de la contaminación son las renovaciones de aire en cada una de las habitaciones. Según el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo [64], en los quirófanos de clase A se recomienda un mínimo de 30 movimientos de aire por hora (renovaciones/hora) independientemente de que el flujo de aire sea laminar o turbulento, en cuanto a los de clase B se recomienda un mínimo de 20 renovaciones por hora, siendo de 15 renovaciones/ hora en los quirófanos de clase C.

En cuanto a la cantidad de aire recirculado, se acepta que en las zonas de grado A parte del aire sea recirculado, con la salvedad de que ha de proceder del mismo habitáculo y ha de tratarse de la misma forma que el aire exterior, siendo el aporte exterior como mínimo de 1200 m³/hora (el aporte mínimo de aire total ha de ser de 2400 m³/hora); lo que supone que cómo máximo se puede recircular el 50% del aire. En las zonas de grado B y C se recomienda que el aire provenga 100% del exterior [65]. En la práctica, siempre que las zonas de grado A no tengan riesgo por gases de anestesia y productos de desinfección, el caudal mínimo exterior puede reducirse según los procesos llevados a cabo en su interior.

Para garantizar una correcta renovación del aire en el interior del área clasificada, es muy importante mantener los retornos libres de obstáculos.

1.4.5.b. Presión diferencial

Otra de las barreras generada por la propia instalación es el mantenimiento de una cascada de presiones, en este caso positiva, de forma que se impida la entrada de aire desde zonas de menor clasificación hacia zonas de mayor clasificación. Las NCF establecen al menos 10-15 pascales de diferencia entre salas adyacentes de grados diferentes (Anexo 1, NCF). Esta cascada de presiones se obtiene a partir de la relación

de aire impulsado, que entra en cada sala por los filtros HEPA terminales, y el aire que es extraído mediante los retornos (además de las posibles pérdidas de la instalación).

Las instalaciones de este tipo suelen disponer de un sistema de enclavamiento de puertas con el fin de evitar que dos puertas que comunican ambientes con grandes diferencias de grado (por ejemplo entre grados D y B) se mantengan abiertas al mismo tiempo.

El comportamiento del personal en el mantenimiento de las cascadas de presión es muy importante, no debiendo mantener las puertas abiertas más del tiempo estrictamente necesario con el fin de evitar que las presiones de dos habitaciones contiguas se igualen.

1.4.5.c. Humedad

El control de la humedad relativa es uno de los aspectos que normalmente ha de tenerse en cuenta cuando se instala un sistema de climatización para salas blancas, ya que de ésta dependen factores tales como el crecimiento bacteriano, la confortabilidad de la sala, el aumento del riesgo de descarga electrostática y la corrosión de metales.

Las bacterias y otros contaminantes biológicos como hongos, virus y ácaros prosperan fácilmente en ambientes con humedades relativas por encima del 60%, incluso algunas bacterias lo hacen con humedades por encima del 30%. Un rango de 40 a 60% en humedad relativa minimiza el impacto de bacterias e infecciones respiratorias [66] y proporciona un ambiente confortable para el personal que realiza sus operaciones.

Una humedad superior proporciona un ambiente húmedo no confortable, mientras que una humedad inferior crea un ambiente seco que puede ocasionar cefaleas, sequedad de boca y agrietamiento de la piel, aumentando el riesgo de descarga electrostática cuando la humedad disminuye por debajo del 30%.

La norma UNE-EN ISO 100713:2005 sobre instalaciones de acondicionamiento de aire en hospitales establece unos márgenes recomendables de humedad relativa del 45 al 55%, mientras que la ASHRAE (American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers) considera aceptables unos márgenes entre el 30 y el 60% [64].

1.4.5.d. Temperatura

Las temperaturas entre los 20 y 45 °C favorecen el crecimiento de bacterias mesófilas.

La norma UNE-EN ISO 100713:2005 recomienda una temperatura de 18 a 26 °C para salas de grado A y B y de 22 a 26 °C en salas de grado C.

1.4.6. Plan de Limpieza y Desinfección de áreas clasificadas

La limpieza y desinfección de las áreas clasificadas destinadas a la fabricación aséptica de medicamentos juega un papel crucial en el mantenimiento del grado de clasificación ambiental y en la eliminación de las partículas generadas por la presencia de personal en

dichas áreas. Las NCF establece que los edificios o instalaciones deben mantenerse, repararse adecuadamente y conservarse en estado limpio; debiendo existir procedimientos escritos que asignen responsabilidades sobre la higiene y describan los programas de limpieza, métodos, equipos y materiales a utilizar en la limpieza de edificios y servicios. [67].

Su principal función es la de remover las partículas sedimentadas en las diferentes superficies de la sala (paredes, suelos, equipamiento, mobiliario) y que las medidas físicas anteriormente descritas no han sido capaces de evitar, así como eliminar los residuos generados durante la fabricación de un producto disminuyendo de esta forma el riesgo de contaminación cruzada hacia otros productos fabricados.

Este Plan de Limpieza y Desinfección requiere la selección de los desinfectantes apropiados, su efectiva aplicación, y la validación de su capacidad para inactivar partículas viables. Además hace necesaria una monitorización microbiológica adicional distinta a la de producción como, por ejemplo, tras la validación de sistemas, limpieza y desinfección [39].

1.4.6.a. Tipos de limpieza

1.4.6.a.1. Limpieza de locales

Las salas blancas deben ser limpiadas y desinfectadas regularmente. Se suelen usar detergentes y desinfectantes que pueden adquirirse preparados o pueden reconstituirse con agua estéril antes de ser utilizados. En todos los casos, estos productos han de ser estériles antes de su utilización.

La técnica generalmente utilizada es la aplicación de un desinfectante, previamente pulverizado en una superficie y la limpieza por arrastre posterior con toallitas mediante pasadas paralelas que se solapan parcialmente. La dirección de limpieza suele ser hacia el operador y procurando que sea en todo momento en el mismo sentido que el flujo de aire.

La limpieza ha de realizarse siempre desde las zonas más limpias a las más sucias y dentro de una misma habitación se han de limpiar, por este orden, techos, paredes, superficies de trabajo, equipos y, finalmente, el suelo.

1.4.6.a.2. Limpieza de equipos

La limpieza de equipos y su aprobación para su posterior utilización en los procesos de producción han de estar documentados y se deben incluir instrucciones completas de cómo se ha de realizar la limpieza, cómo proteger el equipo una vez limpio, y cómo prevenir su contaminación antes de su uso. Los equipos y utensilios han de ser asepsados o esterilizados para impedir la contaminación o arrastre de material que pueda alterar la calidad del medicamento y deben estar identificados en cuanto a su estatus de limpieza [67].

1.4.6.b. Utensilios utilizados para la limpieza de salas blancas

Normalmente en este tipo de instalaciones se utilizan toallitas de baja liberación de partículas. Estas toallitas pueden adquirirse estériles o no y pueden estar secas o bien impregnadas en un determinado desinfectante.

Suelen estar fabricadas a base de una mezcla de celulosa y poliéster (habitualmente 45% de poliéster y 55% de celulosa) no tejidas o bien exclusivamente de poliéster. Las toallitas que contienen celulosa poseen una mayor capacidad de absorción que las de poliéster aunque estas últimas son más resistentes y liberan menos cantidad de partículas. Ambos tipos, disponibles en una amplia variedad de tamaños y de diferentes fabricantes se pueden adquirir gamma irradiadas a un nivel de aseguramiento de la esterilidad de 10^{-6} .

Dependiendo del nivel de calidad de las toallitas, el fabricante habitualmente indica las clases ISO en que puede ser utilizada.

Adicionalmente, para facilitar la limpieza de zonas de difícil acceso se pueden utilizar mopas de acero inoxidable y cubremopas estériles (figura 8).



Figura 8. Personal de limpieza y personal de producción limpiando instalaciones y equipos, respectivamente.

1.4.6.c. Tipos de desinfectantes

Durante décadas se ha utilizado una amplia variedad de agentes químicos (o biocidas) para aseptizar, desinfectar y preservar ambientes y superficies con el fin de prevenir infecciones nosocomiales en el ámbito hospitalario.

Como biocida se conoce a los agentes químicos, usualmente de amplio espectro, capaces de inactivar microorganismos. Dado que los biocidas varían en su actividad antimicrobiana, se utilizan otros términos más específicos tales como bacteriostáticos,

fungistáticos y esporostáticos por su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y esporas respectivamente. También se utilizan las denominaciones de bactericida, esporicida, fungicida y virucida cuando poseen la capacidad de inactivar o matar estos tipos de microorganismos. El mecanismo general de acción es la interacción con la superficie celular del microorganismo y posterior penetración. La interacción con la superficie celular parece tener importantes efectos en la viabilidad de los microorganismos pero la mayoría de estos agentes ejercen su acción letal intracelularmente [68].

Las NCF recomiendan que las instalaciones se limpien cuidadosamente y que estas operaciones se recojan en procedimientos escritos. Cuando se usen desinfectantes, se ha de usar más de uno para utilizarlos de forma rotacional con el fin de evitar la aparición de cepas resistentes.

Usando además diferentes tipos de biocidas, al poseer diferentes mecanismos de acción, es muy probable que el espectro de actuación sea diferente y por tanto se maximice el número de gérmenes susceptibles de ser eliminados.

1.4.6.c.1. Alcoholes

Aunque varios tipos de alcoholes han mostrado ser efectivos antimicrobianos a concentraciones entre el 60 y el 90%, el alcohol etílico (etanol) e isopropílico (isopropanol) son los más ampliamente utilizados [69]. Los alcoholes muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias en estado vegetativo, incluyendo las micobacterias, virus y hongos pero no tienen poder esporicida.

Debido a la inexistencia de actividad esporicida, los alcoholes no son recomendados como agentes esterilizantes pero son comúnmente utilizados para la desinfección de superficies y piel.

Muchos productos con base alcohólica incluyen bajas concentraciones de otros biocidas (por ejemplo clorexidina), que permanecen en la piel tras la evaporación del alcohol u otros excipientes que disminuyen la evaporación del alcohol y aumentan significativamente la eficacia [70]. En general, el alcohol isopropílico es considerablemente más efectivo frente a las bacterias que el alcohol etílico [71].

Generalmente el efecto antimicrobiano de los alcoholes es significativamente menor a concentraciones por debajo del 50%, siendo óptima a concentraciones entre el 60 y el 90%.

1.4.6.c.2. Aldehídos

En este grupo destacan el glutaraldehído y formaldehído.

El glutaraldehído posee un amplio espectro de actividad bactericida, esporicida, fungicida y un potente agente virucida [69,70], especialmente frente a virus como el de

la hepatitis [74]. Posee mayor actividad a pH alcalino y es incluso activo frente a micobacterias.

El formaldehído (CH_2O) es un monoaldehído que existe de forma gaseosa y es soluble en agua. La solución de formaldehído (formalina) es una solución acuosa que contiene del 34 al 38% (peso/peso) de CH_2O con metanol. Su principal uso clínico es como desinfectante y esterilizante en líquido o en combinación con vapor a bajas temperaturas. El formaldehído posee actividad bactericida, esporicida y virucida pero es más lenta que la del glutaraldehído [75].

1.4.6.c.3. *Biguanidas*

La clorexidina se utiliza ampliamente como biocida en productos para el lavado de manos y productos orales. Posee un elevado espectro de eficacia y es apto para usarlo sobre la piel debido a su bajo poder de irritación. A pesar de las ventajas de este biocida, su actividad es dependiente de pH y disminuye drásticamente en presencia de materia orgánica [76]. Posee efecto bactericida [77] y su efecto virucida se limita a los virus con envuelta lipídica [78]. No posee efecto esporicida, ya que incluso elevadas concentraciones no afectan a la viabilidad de las esporas de *Bacillus spp.* a temperatura ambiente [79]. Las micobacterias poseen generalmente una elevada resistencia a la clorhexidina [80].

1.4.6.c.4. *Peróxidos*

Dentro de este grupo se destacan el peróxido de hidrógeno y el ácido peracético (PAA).

El Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) es un biocida usado como desinfectante, esterilizante y antiséptico. Normalmente se comercializa a concentraciones del 3 al 90%. Se considera poco perjudicial para el medio ambiente ya que rápidamente se degrada a productos inocuos (agua y oxígeno). Posee un gran espectro de eficacia frente a bacterias, hongos, esporas y virus [81]. Normalmente para ejercer efecto esporicida necesita mayores concentraciones (10 a 30%) y períodos de contactos más largos que para el resto de efectos. Su actividad aumenta significativamente en estado gaseoso.

El PAA es muy utilizado como desinfectante de superficies ya que es un biocida más potente que el peróxido de hidrógeno, con capacidad bactericida, fungicida, esporicida y virucida a bajas concentraciones [81].

1.4.6.c.5. *Compuestos de amonio cuaternario(QACs)*

Los surfactantes o tensioactivos son agentes químicos activos "en superficies" que poseen dos regiones, una hidrofóbica y otra hidrofílica. Los surfactantes se clasifican, dependiendo de la ionización de la región hidrofílica, en catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros. De ellos, los agentes catiónicos como los compuestos de amonio cuaternario son los más utilizados como antisépticos y desinfectantes [82]. Los QACs son excelentes para la limpieza de superficies, ya que son esporostáticos, inhibiendo el

desarrollo de formas vegetativas a partir de esporas germinadas. Sin embargo, tan sólo poseen efectos virucidas sobre virus con envuelta lipídica [83].

1.4.6.c.6. Ácido Hipocloroso

El ácido hipocloroso (HClO) normalmente se comercializa en forma de sales de hipoclorito o disuelto en agua. El poder desinfectante del cloro o sus compuestos radica en su capacidad de oxidación

1.4.6.d. Validación de la limpieza

El objetivo de la validación de los procedimientos de limpieza es verificar la eficacia de los mismos para eliminar los residuos y degradación de productos, conservantes, excipientes y residuos de los agentes utilizados en la limpieza así como el control de agentes microbiológicos potencialmente contaminantes. Adicionalmente, pretende asegurar que no existen riesgos asociados a la contaminación cruzada de principios activos [84].

1.5. PLAN DE CONTROL DE LA BIOCONTAMINACIÓN AMBIENTAL

En las zonas de ambiente controlado destinadas a la fabricación aseptica de medicamentos se ha de establecer un Plan de Control de la Biocontaminación (PCB) que sea capaz de evaluar y controlar factores que puedan afectar a la calidad microbiológica de los procesos implantados y de los productos fabricados.

Este PCB ha de estar basado en herramientas de Análisis de Riesgos. Aunque existen varias herramientas usadas para el análisis de riesgos tales como el FTA (Fault Tree Analysis) [85] y FMEA (Failure Mode and Effects Analysis) [86], la más utilizada en el ámbito del control de la biocontaminación es la basada en HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) [84, 85].

Para asegurar el control del riesgo de contaminación microbiológica, la herramienta de análisis utilizada ha de ser capaz, entre otras cosas, de [2]:

- Identificar los potenciales riesgos para el proceso o el producto fabricado, evaluar la probabilidad de que sucedan e identificar medidas para la prevención y el control.
- Designar las zonas de riesgo y, en cada una, determinar los puntos, procedimientos y condiciones ambientales que puedan ser controladas con el fin de eliminar los riesgos o reducir su probabilidad.
- Establecer límites que aseguren el control (límites de alerta y acción).
- Implantar un calendario de monitorización ambiental.
- Establecer acciones correctoras cuando se observen que los resultados en un punto determinado, proceso o condición ambiental no están bajo control.

Este Plan de Control de la Biocontaminación ha de ser adaptado de forma específica a cada instalación, teniendo en cuenta aspectos importantes como las características de fabricación de la instalación, tipo de proceso de fabricación implantado, naturaleza del producto fabricado, grado de automatización de los procesos, personal implicado en las labores de producción y de control, volumen de actividad y formación del personal, entre otros aspectos.

El Programa de Muestreo Ambiental (PMA) establecido a raíz del PCB ha de implantarse de forma que las actividades de muestreo por sí mismas no supongan un aumento del riesgo de contaminación del producto ni de la zona a controlar. Este PMA ha de establecer las periodicidades en que se realizarán los controles, qué zonas se han de muestrear y los puntos dónde se tomarán las muestras. Todas las ubicaciones donde se tomarán las muestras han de estar descritas con suficiente detalle en los correspondientes procedimientos escritos con el fin de permitir muestreos reproducibles en una determinada zona. Estos procedimientos escritos tendrán en cuenta aspectos tales como la frecuencia de muestreo, cuándo se realizará la toma de muestras (por ejemplo durante las operaciones de trabajo o después de ellas), la duración, el volumen de aire a muestrear, así como los equipos, medios y técnicas de muestreo a emplear [89].

Además, el PMA, debe establecer unos adecuados niveles de alerta y acción [2], [39], [90], que han de ser establecidos por el usuario y deben adaptarse a las particulares circunstancias de cada instalación y tipo de procesos implantados, pudiendo coincidir o no con los niveles normativamente establecidos. Se deberán establecer medidas correctoras cuando se produzcan desviaciones o superaciones de los niveles de alerta y acción establecidos [2], [89].

Los niveles de alerta han de ser eficaces y proporcionar una señal de aviso sobre una desviación de las condiciones ambientales normales. Cuando estos niveles se sobrepasan debería repercutir en un aumento de la atención en el proceso.

Los niveles de acción, una vez excedidos, requieren una intervención inmediata que incluya una investigación de las causas y la implantación de medidas correctoras.

En PMA puede ser muy útil para proporcionar un nivel basal de biocontaminación si se aplica de forma temprana. De este modo, un control de las condiciones de contaminación cuando una instalación acaba de construirse (estado “as-built”) sin personal ni equipo en su interior puede proporcionarnos una idea acerca del nivel de contaminación y medidas que hemos de implantar para reducir su carga microbiana y si éstas son efectivas o no.

En una segunda fase, una vez que hemos equipado nuestra instalación (estado “en reposo”), los controles realizados nos pueden proporcionar una idea de la contaminación ocurrida durante el proceso de equipamiento y si las medidas físicas (sistema HVAC) y especificaciones en el estado "en funcionamiento" de la instalación son capaces de proporcionar y mantener un aire de la calidad necesaria. También es útil para comprobar

Introducción

que los materiales introducidos poseen la adecuada calidad y no son fuente de contaminación.

Los controles y el análisis de los datos obtenidos durante estas dos primeras etapas nos resultarán útiles para comprobar si las medidas de limpieza y desinfección implantadas son efectivas, detectar fuentes de contaminación y por supuesto, para establecer unos adecuados niveles de alerta y acción.

El PMA ha de realizarse rutinariamente durante los períodos de funcionamiento normal de la instalación, es decir, aquellos períodos en que la instalación está siendo utilizada, con el personal realizando sus tareas habituales y los equipos en funcionamiento.

Los controles realizados en esta última fase nos proporcionarán unos niveles de alerta y acción reales según los procesos implantados y el número de actividades realizadas y de personal que las realiza; indicarán si los procedimientos de limpieza y su frecuencia, desinfectantes utilizados, los procesos de entrada y vestuario implantados son eficaces para contrarrestar la biocontaminación generada en momentos de ocupación y bajo condiciones reales de trabajo.

Estos niveles de alerta y acción deberían revisarse periódicamente para adaptarlos a las cambiantes circunstancias de cada instalación.

1.5.1. Análisis de los resultados del PMA. Análisis de Tendencias.

Los resultados del PMA proporcionarán información sobre la calidad del ambiente en las diferentes zonas. Cada resultado individual debe ser valorado en comparación con los niveles de alerta y acción, ya que el promedio de resultados puede enmascarar resultados inaceptables [89].

Además, estos resultados debido a su variabilidad y a la escasa significancia de crecimientos aislados, deben analizarse mediante el uso de herramientas basados en Análisis de Tendencias [2, 88]. La frecuencia de monitorización ha de ser suficiente para reconocer tendencias [92]. Deberían analizarse tanto los recuentos como los microorganismos aislados con el fin de emitir un informe periódico que resumiera todas las observaciones y tendencias. Estos informes de tendencias deberían incluir los datos generados por localización, turno, habitación o sala, operador y otros parámetros [89], [92].

Se deben emitir informes de los datos obtenidos (por ejemplo sobre un determinado microorganismo aislado durante un período de tiempo de un año) con el objetivo de investigar los resultados que excedan los niveles establecidos para intentar identificar e implantar medidas de seguimiento apropiadas. Deben considerarse los cambios significativos en la flora microbiana durante la revisión de los datos de monitorización ambiental [89].

Sin embargo, los datos cuantitativos en este tipo de controles ofrecen serios retos para los microbiólogos. Existe variaciones en los resultados obtenidos debido a las limitaciones propias de los métodos de muestreo (momento de toma de muestra, actividad previa en la zona a muestrear, número de entradas de personal a la instalación, tiempo transcurrido durante la última limpieza y desinfección, etc.) la variedad de los microorganismos presentes y el estado metabólico de los mismos (ya que se encuentran en superficies inertes o sobre partículas en suspensión), que hacen que los estudios de los datos de recuperación microbiológica ambiental pierdan su significado y se conviertan en datos difícilmente interpretables.

Como ayuda a la interpretación de los datos obtenidos, los resultados deben evaluarse analizando largos períodos temporales con el fin de determinar tendencias. Basándose en la revisión de las tendencias detectadas y en los resultados individuales de los controles realizados se podrán tomar decisiones sobre resultados inusuales y la aceptabilidad de los procesos realizados y productos fabricados bajo esas condiciones [2].

1.5.2. Métodos utilizados para el control microbiológico ambiental

Los métodos aceptados y comúnmente utilizados [2], [93], [39], [90], [94] son:

1.5.2.a. Muestreo volumétrico de partículas viables en aire (muestreo activo de aire).

Este tipo de muestreo implica el uso de un dispositivo que recoja y haga impactar un volumen determinado de aire sobre una placa Petri con un medio de cultivo bacteriano. Se pueden utilizar muestreadores de impacto, de centrifugación o de membrana. Cada dispositivo tienen una serie de ventajas y desventajas pero todos ellos permiten obtener un número de microorganismos por volumen de aire muestreado.

Se recomienda que este tipo de muestreo se realice en lugares cuidadosamente seleccionados durante cada turno de producción, con el fin de evaluar las zonas de mayor riesgo durante el procesamiento aséptico. Se debe evaluar la idoneidad de este tipo de dispositivos para ser utilizados en un ambiente aséptico. Esta evaluación puede basarse en aspectos tales como la eficiencia de recolección, limpieza, capacidad de esterilización o aseptización y la interrupción del flujo de aire unidireccional [89].

Los muestreadores por impacto en medio líquido (en inglés “impigets”) no son recomendables para muestrear partículas viables debido al pequeño volumen de muestra que son capaces de tomar y a la capacidad de romper agregados (clumps) de partículas viables [2]. Los más utilizados son los muestreadores por impacto en medios de agar sólidos.

El flujo de aire generado por el equipo muestreador ha de ser lo suficientemente alto para recolectar todas las partículas de tamaño superior a 1 μm y lo suficientemente bajo como para evitar el daño estructural de las partículas viables al ser impactadas sobre la superficie de agar. El volumen de aire muestreado ha de ser suficiente como para

detectar niveles muy bajos de biocontaminación esperados en salas blancas y ser lo suficientemente pequeño para evitar la degradación física o química del medio de cultivo [2].

1.5.2.b. Muestreo por sedimentación de partículas viables (muestreo pasivo de aire)

Se realiza mediante la exposición al ambiente, durante un tiempo no superior a 4 horas, de la superficie de agar de una placa de 90 mm de diámetro. El objeto de este tipo de muestreo es recoger las partículas viables en suspensión, que tienden a depositarse sobre una superficie a una velocidad variable de entre 0,2 a 3 m/s [95] y que depende directamente del tamaño de cada partícula.

Su valor en áreas críticas se incrementa si se sitúa el muestreador en las localizaciones que tienen el mayor riesgo para contaminación del producto.

1.5.2.c. Control de superficies, equipos y personal

Este tipo de muestreo consiste en tomar muestras de partículas viables de diferentes superficies como suelos, paredes, equipos, personal, etc. Se puede realizar mediante el método de placas de contacto o el uso de torundas o hisopos [90]. Existen diferencias entre ambos métodos en cuanto a la capacidad de recolectar los microorganismos de las superficies donde se encuentran. Ambos métodos poseen limitaciones pero el uso de placas de contacto es habitualmente utilizado para tomar muestras de superficies lisas y planas.

Las placas de contacto tipo Rodac de 55 mm de diámetro (25 cm² de superficie de contacto) se rellenan del medio de cultivo suplementado con agar que se desee según el tipo de microorganismos que se pretenda aislar. Una vez seleccionada la superficie a muestrear, se abre la placa de contacto y se aplica el medio nutritivo durante 10 segundos, ejerciendo una ligera presión de forma que toda la superficie del agar esté en contacto con la superficie a muestrear. Tras el período de contacto, se retira la placa de la superficie y se coloca la tapa. Es extremadamente importante retirar los restos de medio nutritivo que quedan adheridos a la superficie muestreada, utilizando toallitas estériles y alcohol 70 %.

Con el fin de evitar la contaminación cruzada, así como minimizar los efectos de una posible contaminación propia de las labores de muestreo, las muestras se toman comenzando por las zonas de mayor clasificación (grado A) y finalizando por las zonas de menor clasificación (grado D).

1.5.2.d. Impronta de guantes

Este control se realiza en todas las operaciones críticas realizadas en grado A tal y como establece el Anexo 1 de las NCF. Para ello, en el interior de las cabinas de flujo laminar y justo al finalizar las operaciones en grado A, se abre una placa de Petri de 90 mm con agar Tripticasa de Soja (TSA) y se presiona ligeramente durante 10 segundos con las

Introducción

yemas de los cinco dedos de una de las manos. Se repite la operación, en otra placa diferente, con la otra mano. Finalmente se aseptizan las manos con alcohol 70% y se secan para eliminar los restos de medio nutritivo.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hipótesis de trabajo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los medicamentos de Terapia Celular están sujetos a contaminación microbiológica, lo que puede representar un riesgo para la salud de los pacientes a los que se les administren y causar deterioro del medicamento y una posible pérdida de la eficacia terapéutica. La contaminación asociada a estos medicamentos puede provenir de los tejidos fuentes a partir de los que se obtienen las células, de los reactivos utilizados para su cultivo y expansión in vitro, introducida durante el proceso de fabricación por equipos mal descontaminados, por el personal que realiza las labores propias de los procesos de fabricación o a partir del ambiente donde se realiza la fabricación aséptica de medicamentos.

La optimización del Control de la Biocontaminación en la fabricación aséptica de medicamentos de Terapia Celular requiere del desarrollo e implementación de sistemas capaces de identificar los posibles riesgos relacionados con los procesos de fabricación, del establecimiento de límites de alerta y acción útiles y de la implantación de medidas preventivas y correctoras adecuadas y eficaces.

La evaluación de los factores que pueden comprometer la calidad microbiológica de los productos ha de estar basada en herramientas de Análisis de Riesgos que reflejen un profundo conocimiento de los procesos de fabricación, de forma que el control del proceso de fabricación aséptica sea sólido, estable, adaptado a cada proceso e instalación, capaz de controlar y detectar tendencias, de generar resultados valorables y detectar y controlar los puntos críticos de cada proceso.

El Plan de Control de la Biocontaminación en zonas de ambiente clasificado proporcionará información significativa sobre la calidad del ambiente donde se realiza el proceso de fabricación aséptica, así como de las tendencias de biocontaminación ambiental. Su propósito fundamental es documentar el estado de control de la instalación, no determinar la calidad del producto terminado, aunque es evidente que la rápida identificación de posibles vías de contaminación junto con un adecuado plan de control, permitirá la implementación de medidas correctoras que minimicen el impacto sobre la calidad del producto fabricado.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. OBJETIVOS

Objetivo 1. Demostrar la idoneidad de los medios de cultivo microbiológico y métodos de muestreo para la monitorización ambiental del área clasificada y la verificación de la esterilidad de los medicamentos fabricados.

1.1. Verificar la capacidad de promoción de crecimiento de los medios usados.

1.2. Comprobar el efecto de la deshidratación sobre placas de TSA utilizadas para los muestreos volumétricos de aire y sedimentación de partículas

1.3. Verificar si los residuos de agentes desinfectantes utilizados en los procesos de limpieza y aseptización de las instalaciones interfieren con la capacidad de promoción de crecimiento bacteriano de las placas utilizadas en los muestreos de superficies.

1.4. Evaluar la modificación de los métodos de muestreo ambiental implantados.

1.5. Validar el ensayo de esterilidad según Eur. Ph. 2.6.27.

Objetivo 2. Diseñar e implantar los procedimientos de limpieza necesarios para preservar las condiciones ambientales exigidas para la fabricación aséptica de medicamentos en la Unidad de Producción Celular (UPC).

2.1. Demostración de la capacidad germicida de los desinfectantes utilizados y verificación de su esterilidad en el tiempo.

2.2. Diseño, validación e implantación de un procedimiento de limpieza adaptado a las necesidades de la instalación.

Objetivo 3. Identificar los puntos críticos de riesgo de biocontaminación ambiental en el proceso de fabricación aséptica implantado.

3.1 Recogida de datos previos y realización de análisis de riesgos.

3.2. Establecimiento de un Plan de Control de la Biocontaminación.

3.3 Implantación de las medidas de control surgidas del análisis de riesgos.

3.4. Identificación de la microbiota residente en la instalación.

Objetivo 4. Evaluar los datos de biocontaminación ambiental mediante herramientas basadas en análisis de tendencias. Valoración de la eficacia de los procedimientos implantados.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Material y Métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. CUESTIONES PREVIAS

4.1.1. Descripción de la instalación

La UPC se encuentra ubicada en la planta 7ª del Pabellón A del Hospital Regional Universitario de Málaga. Las instalaciones comprenden 2 áreas generales denominadas “área no clasificada” y “área clasificada” (salas de ambiente controlado según lo establecido en la norma ISO-14644-1).

Área no clasificada: zonas donde se ubican el laboratorio de Control de Calidad, área administrativa, depósito de vestuario y zona de recogida de producto terminado. En el laboratorio de Control de Calidad se encuentran las estufas (incubador de precisión IPP 500 IPP y estufa IFE 500, Memmert Inc. Germany) utilizadas para el cultivo de las placas procedentes de los controles ambientales.

Área clasificada: zonas (habitaciones) con diferentes grados de clasificación según lo establecido en la norma ISO 14644-1 (tabla 7).

<i>Zonas</i>	<i>Grado de clasificación ambiental</i>	<i>Flujo</i>
Vestuario D (VD)	Grado D	Turbulento
Distribuidor (D)		
Almacén GMP (Alm)		
Vestuario C	Grado C	
Vestuario B	Grado B	
Salas de Producción 1, 2 y 3 (SP1, SP2 y SP3)		
Cabinas de flujo laminar (2 en SP1, 2 en SP2 y 1 en SP3)	Grado A	Laminar

Tabla 7. Grado de clasificación ambiental de cada zona del área clasificada de la UPC del HRU de Málaga.

La distribución de estas zonas puede observarse en la Figura 9.

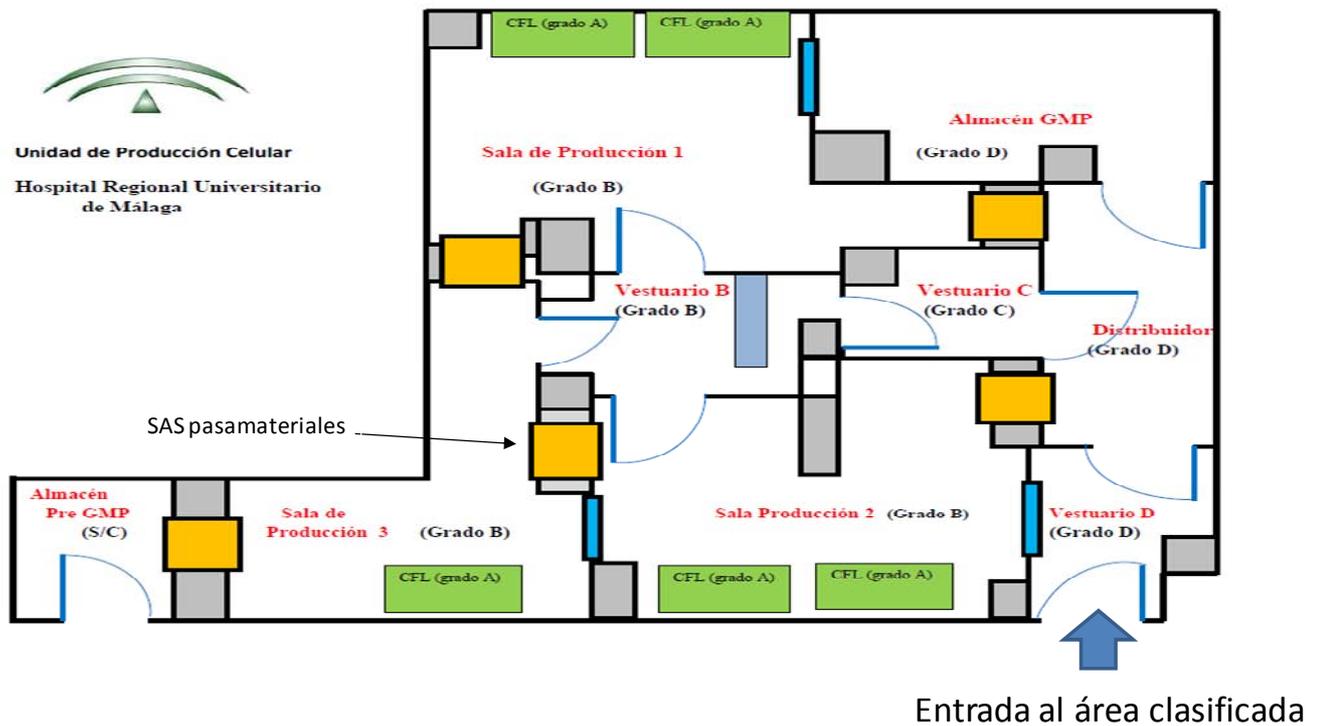


Figura 9. Plano de planta de la UPC del HRU de Málaga mostrando la distribución de los diferentes grados de clasificación ambiental.

El acceso a las diferentes salas está controlado por una centralita que regula el sistema de enclavamiento de puertas de forma que no es posible la apertura accidental de dos puertas de forma simultánea, evitando así el paso de aire entre salas no contiguas y manteniendo la cascada de presiones positivas entre las diferentes salas.

El sistema HVAC está formado por tres climatizadores que impulsan y filtran el aire exterior según el caudal de impulsión programado para cada área y genera una cascada de presiones positivas de 10-15 pascales de diferencia entre salas adyacentes de grados diferentes (Anexo 1, NCF).

Una enfriadora se encarga de mantener la temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) y la humedad relativa (38-40%). Los filtros HEPA terminales y luminarias se encuentran ubicados en el techo y los retornos de aire en las paredes, aproximadamente a 50 cm del suelo.

Cada climatizador está compuesto por un sistema de filtración que consta de tres filtros, dos de ellos situados en el propio climatizador (prefiltro clase G4 y filtro de alta eficacia F9) y un tercer filtro absoluto HEPA (H-14) situado en los elementos terminales de los difusores (techos de la instalación). Además, posee una serie de elementos de control y de alarma de los parámetros establecidos:

- sonda de presión para regulación del caudal del ventilador;
- sonda de temperatura en el conducto de impulsión;
- sonda combinada de temperatura y humedad relativa en el conducto de retorno;

Material y Métodos

- presostatos para los filtros G4, F9 y H14 que activarán alarmas cuando se sobrepase la presión diferencial de colmatación de los mismos;
- sonda de presión para monitorización de la presión en la sala.

La regulación de los caudales de aire de retorno se realiza a través de compuertas de regulación manuales y de caudal variable. Con el fin de mantener la eficiencia de la instalación, el 50% del aire es recirculado y filtrado de nuevo a través de los filtros F9 y HEPA terminales.

Se genera de esta forma un flujo de aire turbulento en todas las habitaciones. El flujo laminar necesario para el grado A de clasificación se consigue gracias a la instalación de cabinas de flujo laminar en las Salas de Producción de grado B.

El aire suministrado a cada una de las Salas de Producción (grado B) es controlado por climatizadores independientes de forma que se evita que el aire de una Sala de Producción entre en contacto con el aire de las otras dos, e impidiendo, de esta forma, la contaminación cruzada entre productos manipulados en diferentes salas.

En la tabla 8 se detallan las zonas controladas por cada climatizador y parámetros ambientales a mantener.

Climatizador	Áreas controladas	Superficie (m ²)	Clasificación NCF	Clasificación ISO	Sobrepresión (Pa)*	Renovaciones/hora
CL-01	SP 2	13,88	B	ISO 5	55 ± 5	60 ± 20%
CL-02	SP 3	11,28	B	ISO 5	55 ± 5	60 ± 20%
	VB	6,71	B	ISO 5	45 ± 5	60 ± 20%
	VC	3,77	C	ISO 7	30 ± 5	35 ± 20%
	Almacén GMP	9,44	D	ISO 8	20 ± 5	20 ± 20%
	Distribuidor	6,72	D	ISO 8	20 ± 5	20 ± 20%
	VD	4,31	D	ISO 8	20 ± 5	20 ± 20%
CL-03	SP 1	17,62	B	ISO 5	55 ± 5	60 ± 20%

Tabla 8. Parámetros ambientales críticos de las diferentes salas del área clasificada de la UPC del HRU de Málaga. *Respecto al exterior de la instalación.

Zonas de grado D

El Vestuario D sirve de acceso al área clasificada desde el exterior, posee un monitor para controlar los parámetros críticos de la sala desde donde se pueden programar los climatizadores y la enfriadora. Muestra un mapa de la planta a tiempo real en el que se pueden comprobar el estado de la presión y temperatura en cada una de las salas.

El Distribuidor es el lugar de paso entre las diferentes zonas de grado D y el acceso al Vestuario C; es utilizado además para aseptizar e introducir en los SAS los materiales necesarios en el proceso de fabricación aséptica.

Material y Métodos

El Almacén GMP es el lugar donde se almacenan los materiales fungibles aprobados y posee, además, una cámara refrigeradora (2-8°C) para almacenar los medios de cultivos utilizados en las labores de producción.

Zonas de grado C

El Vestuario C se utiliza para el segundo cambio de vestimenta y es de paso obligado para entrar hacia las zonas de grado B. Se encuentra equipado, al igual que las zonas de grado B con filtros HEPA terminales.

Zonas de grado B

El Vestuario B conecta el vestuario C con las tres Salas de Producción y a éstas entre sí. Cuenta con un banco de acero inoxidable que es utilizado para separar las zonas “sucias” y “limpia” del vestuario, y en él se finaliza el proceso de vestimenta.

Las Salas de Producción 1, 2 y 3 (figura 10) poseen el equipamiento necesario para realizar el aislamiento, expansión y envasado de los productos fabricados según NCF: cabinas de flujo laminar, incubadores con noria, centrifugas, pesos, microscopios e incubadores de CO₂.

El CO₂ necesario para los incubadores se suministra a través de un sistema de tuberías a partir de balas de CO₂ situadas en el exterior del área clasificada. El sistema se encuentra regulado por una serie de manómetros individuales para cada incubador y posee un sistema de alarma 24 horas.



Figura 10. Detalle de las Salas de Producción 1, 2 y 3.

Material y Métodos

Existen equipos SAS pasamateriales ventilados dobles (compartimentos independientes de entrada y salida de materiales) y con sistema de esterilización por radiación UV que comunican el Distribuidor con las Salas de Producción 1 y 2, y la zona de recogida del producto terminado con la Sala de Producción 3. A su vez, la comunicación entre estas salas y la Sala de Producción 3 se realiza mediante SAS pasamateriales no ventilados. Estos equipos se utilizan para la adecuada aseptización e introducción de materiales a las zonas de grado B y entre las diferentes Salas de Producción.

4.1.2. Actividad de la Unidad de Producción Celular

La UPC se encuentra acreditada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios para la fabricación aséptica de medicamentos basados en Terapia Celular. El producto en investigación sujeto a ensayo clínico es una suspensión de Células Mesenquimales Troncales adultas derivadas de tejido adiposo (CMMTAd) para uso autólogo, expandidas mediante cultivo celular hasta alcanzar la dosis aleatorizada para cada paciente y envasadas y acondicionadas para su infusión intravenosa en Ringer lactato suplementado con 2,5% glucosa y 1% de albúmina sérica humana [96].

Todos los datos recogidos en esta Tesis proceden de la monitorización ambiental durante el proceso productivo de 2 ensayos clínicos:

- CMMAd/InFe/2011: Estudio Fase I/II, multicéntrico, doble ciego, aleatorizado, comparativo en dos grupos para evaluar la seguridad y eficacia de células mesenquimales troncales autólogas de tejido adiposo en el tratamiento de la incontinencia fecal (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02292628)
- CeTMAd/ELA/2011: Ensayo clínico Fase I/II, multicéntrico, aleatorizado, controlado con placebo, triple ciego, para evaluar la seguridad, factibilidad y valoración de tendencia de eficacia de la administración intravenosa de la terapia con 3 dosis de células mesenquimales autólogas de tejido adiposo en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) moderada a severa (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02290886).

4.1.2.a. Descripción del proceso de fabricación de Células Mesenquimales Troncales Adultas derivadas de Tejido Adiposo

El proceso de fabricación de medicamentos (figura 11) se realiza conforme a los estándares establecidos en las NCF. A continuación, se describen esquemáticamente las etapas del proceso, a fin de comprender los controles ambientales que se realizan en cada una de ellas.

4.1.2.a.1. Extracción del tejido adiposo y transporte del mismo hacia la Unidad de Producción Celular

El proceso de fabricación de productos basados en CMMTAd para su uso autólogo comienza con la selección del paciente para lo cual se realiza un estudio serológico

Material y Métodos

(Hepatitis B –antígeno de superficie y anticuerpo core-, hepatitis C –anticuerpos totales-, anticuerpos HIV I+II y Sífilis –RPR, VDRL o anticuerpos totales), comprobación de su idoneidad y firma del consentimiento informado por parte del mismo. Tras completar los requerimientos documentales, a cada paciente se le extrae un fragmento de tejido adiposo subcutáneo abdominal (material de partida) mediante exéresis quirúrgica aséptica o liposucción, que se introduce en un recipiente estéril y se cubre con solución salina estéril para ser enviado inmediatamente a la UPC mediante un kit de transporte con monitorización de temperatura (2 a 20 °C).

4.1.2.a.2. Preparación, disgregación mecánica y disgregación enzimática del tejido

Una vez recibido, el tejido adiposo se introduce en las Salas de Producción, grado B. para ser pesado. A partir de este momento, todas las fases del proceso se realizan en el interior de las cabinas de flujo laminar (CFL) clase II, tipo AII (Grado A) situadas en un entorno con grado B.

- Dentro de la CFL, se toman los controles de esterilidad del suero fisiológico que acompaña a la muestra y se añade una solución de lavado que contiene 40 µg/mL vancomicina (Laboratorios Normon, Madrid) y 160 µg/mL de gentamicina (Laboratorios Normon, Madrid) en tampón Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA) durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, con la intención de descontaminar el tejido.
- Posteriormente, se eliminan, en la medida de lo posible, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo y se procede a la disgregación mecánica de la pieza con bisturís y pinzas estériles hasta conseguir una especie de papilla homogénea.
- Se continúa con una disgregación enzimática mediante la adición de 0,3 UI de colagenasa grado GMP estéril (Collagenase NB 6 GMP Grade, Nordmark–Serva. Uetersen. Dinamarca) por gramo de tejido, e incubación a 35-38°C durante un mínimo de 60 minutos.

4.1.2.a.3. Obtención de células de la fracción vaso-estromal (FVE) del tejido adiposo

Transcurrido el tiempo de digestión, se introducen los tubos en la CFL y se neutraliza el efecto de la colagenasa con el mismo volumen de medio de expansión [Dulbecco's Modified Eagle's Medium bajo en glucosa (Sigma-Aldrich)] suplementado con 2% L-glutamina 200 mM (Sigma-Aldrich) 10% suero bovino fetal (SAFC, St. Louis, USA) y 0,1 mg/ml gentamicina (Laboratorios Normon. Madrid, España)] y se centrifuga a 300-500 g durante 12 minutos.

- Tras la centrifugación quedan cuatro fases: Fase superior aceitosa, Interfase semisólida, Fase acuosa, Botón de células. Se transfieren las interfases semisólidas y los botones celulares a un contenedor estéril, diluyendo en un volumen igual de PBS. Esta solución se filtra a través de una malla estéril de 100 µm (Cell strainer; Corning-Falcon, New York, NY, USA) con el fin de retener los restos de tejido conectivo que

Material y Métodos

hayan podido quedar sin digerir, y se centrifuga a 800-1000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- Se resuspenden los botones celulares en medio de expansión, transfiriendo todas estas suspensiones a un único tubo estéril, para realizar recuento y viabilidad mediante el test de exclusión con azul tripán (Sigma-Aldrich) en cámara de Neubauer con el fin de conocer el número de células nucleadas obtenidas para poder calcular la densidad de la siembra inicial en flask de cultivo.
- Se procede a la siembra inicial de la FVE (mezcla heterogénea de células mesenquimales, hematíes, leucocitos, linfocitos, monocitos y fibroblastos) en flask de cultivo, que se introducen en los incubadores, donde se incuban durante 24-48 horas en atmósfera al 5% de CO₂, a 35-39 °C, y 95% de humedad relativa.

4.1.2.a.4. *Mantenimiento del cultivo celular: cambio de medio de expansión y subcultivos.*

- Transcurridas 24-48 horas, se aspira el medio de cultivo, eliminando todas aquellas células que no se hayan adherido a la superficie de plástico del frasco de cultivo. Se lava la monocapa de células adherentes con PBS y se añade medio de expansión. Los flask de cultivo se incuban durante otras 24-48 horas hasta el próximo cambio de medio.
- Estos pasos se repiten hasta que la confluencia de la monocapa celular sea $\geq 80\%$, momento en que se realiza el subcultivo celular, que consiste en despegar las células del flask de cultivo con la ayuda de una solución de tripsina sintética (TrypLE Select. Gibco®-Invitrogen, Life-Technologies, Madrid) que degrada las proteínas de la matriz extracelular. Se neutraliza el efecto de la tripsina con medio de expansión, se homogenizan bien las suspensiones celulares y se centrifugan a 800-1000 g durante 10-15 minutos. Se retira el sobrenadante, se resuspende el botón de células de cada tubo en medio de expansión y se transfieren las suspensiones celulares a un único tubo estéril. Se realiza el recuento celular, ensayo de viabilidad y cálculo de la superficie de siembra.
- Se resuspenden las células en el volumen necesario de medio de expansión para tener una densidad de siembra de 2500 - 5000 células viables/cm², y se transfiere la suspensión celular a los frascos elegidos. Se introducen los frascos en atmósfera de 5% de CO₂, a 37° C, y se mantienen realizando cambios de medio de cultivo hasta conseguir un porcentaje de confluencia en el cultivo celular $\geq 80\%$, momento en el que se procede a un nuevo subcultivo de las células.
- Los cambios de medio y los subcultivos se repiten hasta que se obtenga el número de células indicado para el paciente que se está tratando, momento en el que se procederá al envasado y acondicionamiento final de las células.

4.1.2.a.5. *Recuperación para envasado y obtención del Producto Terminado.*

- Se centrifuga la suspensión celular obtenida en el último subcultivo, se retira el sobrenadante y se resuspende el botón de células en lactato de Ringer (Baxter,

Material y Métodos

Valencia) con 1% de albúmina humana (Laboratorios Grifols, Barcelona) y 2,5% de glucosa (Glucosa 50%, B. Braun Medical S.A., Barcelona), transfiriendo las suspensiones celulares a un único tubo o contenedor estéril.

- Se realiza recuento celular y ensayo de viabilidad. Se ajusta la concentración celular, según brazo de aleatorización, adicionando lactato de Ringer suplementado con albumina humana y glucosa, y se toman muestras para Control de Calidad:
 - Esterilidad, Gram y Calcoflúor
 - Endotoxinas
 - Fenotipo y cariotipo
 - Se criopreserva la Muestra de referencia
- Se envasa la suspensión celular en jeringas estériles con cono y cierre Luer-Lok (Becton-Dickinson, Madrid), identificándolas de forma inequívoca con una etiqueta en la que figure el nombre del producto, el código de referencia del ensayo, código de paciente, código lote, fecha y hora de caducidad, vía de administración y en la que se detalle que el producto ha de permanecer entre 2 y 20°C.
- Se introducen las jeringas en una bolsa estéril identificada con una etiqueta de acondicionamiento secundario, se sacan por los SAS pasamateriales, y se conservan en control de calidad entre 2-20°C mientras se esperan los resultados de los controles de micoplasma, endotoxinas, Gram y calcoflúor, así como del fenotipo celular.
- Una vez se hayan obtenido los resultados y éstos sean correctos, se procederá a la liberación técnica temprana del producto por el director técnico, y se enviará inmediatamente la documentación al promotor, para que éste realice la liberación administrativa y se proceda al envío del lote. Los resultados del ensayo de esterilidad están listos en 7 días, mientras que los del cariotipo tardan entre 2-3 semanas, procediéndose a la liberación final.

4.1.2.a.6. *Envío de las células madre mesenquimales para su infusión*

Se introduce la bolsa con el medicamento en un embalaje térmico con los acumuladores de frío, y un registrador de temperatura continuo. Se cierra el embalaje, se adjunta la ficha técnica, manual de uso del medicamento y los documentos para rellenar en el hospital al que se envía el medicamento y se procede al transporte, asegurándose en todo momento de que la temperatura se mantenga entre 2-20°C.

Material y Métodos

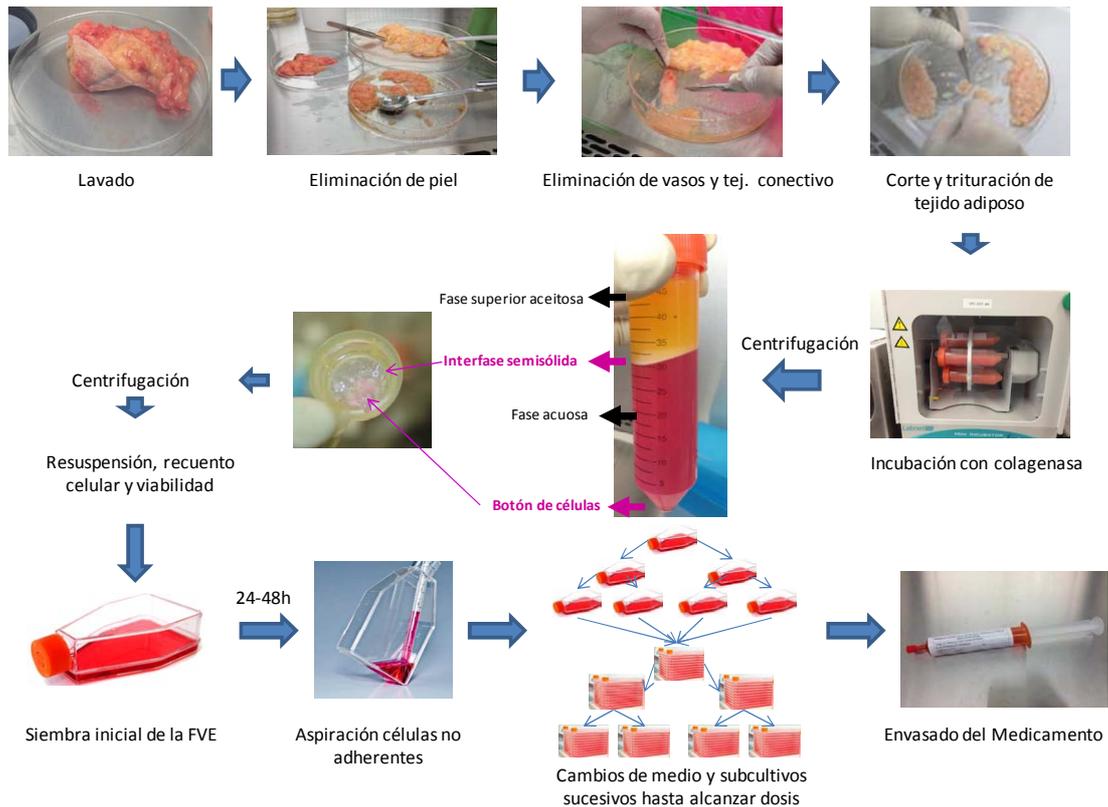


Figura 11. Esquema resumen del proceso productivo de medicamentos basados en CMMTAd.

4.1.3. Medidas generales para evitar la biocontaminación del área clasificada

Se diseñó inicialmente un procedimiento de entrada al área clasificada respetando las exigencias acerca de la indumentaria establecidas en el anexo 1 de las NCF.

4.1.3.a. Normas de vestuario y entrada de personal

El acceso al área clasificada está restringido a personal autorizado tras el correspondiente período de formación y se realiza mediante la apertura de puertas exclusivamente mediante el uso de tarjetas electrónicas.

A continuación, en la figura 12, se muestra un esquema de la instalación con los principales puntos relevantes en cuanto a procedimiento de entrada de personal:

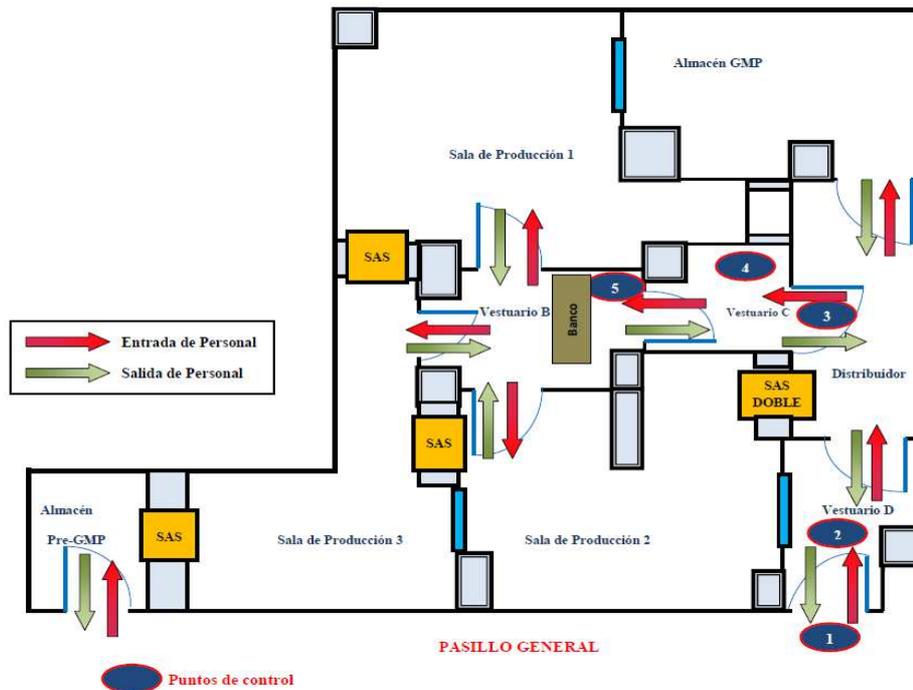


Figura 12. Esquema mostrando los flujos de entrada y de salida de personal en el área clasificada y los puntos relevantes del proceso.

En todos los vestuarios existen estanterías y papeleras de acero inoxidable especialmente diseñadas para su utilización en zonas de ambiente clasificado. Se dispone, además, de espejos para comprobar la adecuada colocación de las diferentes prendas.

Punto de control nº 1: Acceso a Vestuario D (exterior del área clasificada).

Antes de acceder al vestuario D se observarán las siguientes normas:

- A los fumadores se les recomienda beber agua antes de entrar para disminuir la emisión de partículas.
 - Se recomienda ir al servicio.
 - No está permitido el acceso con relojes, pulseras, pendientes, colgantes y cualquier otro tipo de joya o abalorio.
 - El maquillaje ha de ser previamente retirado.
 - Se ha de realizar un lavado de cara, manos y antebrazos con agua y jabón neutro
- i. Procedimiento en casos en que la entrada se realice para manipular o reponer material aprobado en el Almacén GMP (grado D) o como apoyo al personal de producción, no siendo necesario continuar el acceso hacia zonas de mayor clasificación. Se accederá al Vestuario D con:
- bata hospitalaria sobre la ropa de calle.

Material y Métodos

- zuecos de trabajo con al menos 3 cubre calzas en cada uno de los zuecos (sentados en una silla y sin que el pie/zueco apoye el suelo, se colocarán los cubre calzas uno sobre otro).
 - gorro protector.
- ii. Procedimiento en caso de que la entrada al Vestuario D se realice con el fin de acceder a las zonas de mayor clasificación ambiental:
- antes de acceder al Vestuario D se sustituirá el calzado de calle por zuecos de plástico esterilizables (Calzuro, Plain City, Ohio, USA). Sentados en una silla, y sin que el pie/zueco apoye el suelo, colocaremos uno sobre otro, al menos 5 cubre calzas en cada uno de los zuecos.
 - gorro protector

En ambos casos, tras la apertura de la puerta de acceso, se retirará el primer par de calzas que estuvieron en contacto con el suelo del pasillo general. El pie al que se ha retirado la primera calza se apoyará en el suelo del Vestuario D sobre una alfombra adhesiva que retendrá las partículas de mayor tamaño adheridas a los cubre calzas. Una vez apoyado el primer pie, se procederá igualmente con el segundo.

El Vestuario D tiene una sobrepresión de 20 ± 5 pascales respecto al aire exterior. Este proceso se realiza de la forma más rápida posible para evitar la entrada de aire al interior de la instalación y evitar que las presiones a ambos lados de la puerta de acceso se igualen.

Punto de control nº 2: cambio de Vestuario en grado D

En caso de que no se pretenda acceder más allá de las zonas de grado D:

- se colocará un par de guantes no estériles que serán seguidamente asepsizados con alcohol etílico o isopropílico al 70%, dejándolos secar al aire. De esta forma podemos desplazarnos por las diferentes zonas de grado D (Vestuario D, Distribuidor y Almacén GMP).

En caso de que se pretenda acceder a zonas de grado C o B:

- se sustituirá la ropa de calle y bata hospitalaria por un traje protector o popelín (Ánade, Pozuelo de Alarcón, Madrid) especialmente diseñado para el acceso a salas blancas. El traje protector o popelín es de dos piezas (la parte superior de manga larga) y está fabricado en un 99 % de poliéster y 1% de fibra de algodón. Es apto para ser utilizado en salas blancas clase ISO 7 o bien como pijama interior en salas clase ISO 5 (según normativa IEST-RP-CC-003). Los extremos del traje en las muñecas y tobillos están compuestos por material elástico. Este traje tiene como función principal retener las partículas liberadas por el cuerpo.

Material y Métodos

- se colocará un primer par de guantes no estériles que serán seguidamente asepticados con alcohol 70 %.

Punto de control nº 3: Acceso a grado C.

Tras la apertura de la puerta se retirarán un segundo par de calzas. Es importante que la calza que ha estado en contacto con el suelo de las zonas de grado D no entre en contacto con el suelo del Vestuario C.

Punto de control nº 4: Cambio de vestuario en grado C.

A esta sala hemos accedido con el gorro protector, par de guantes no estériles, traje protector de baja liberación de partículas y zuecos cubiertos con calzas.

El primer paso es la colocación de una mascarilla estéril (Kimtech Pure Brand™. Kimberly-Clark, Inc. UK) con el fin de prevenir la dispersión de aerosoles.

A continuación, se retirarán los guantes no estériles y se colocarán un primer par de guantes estériles (Mediguard Surgical Gloves. Medline Industries, Inc. Mundelein, Illinois, USA). Se tendrá la precaución de que los guantes queden por encima de la manga del traje protector.

Punto de control nº 5: Cambio de vestuario en grado B.

El Vestuario en grado B tiene la particularidad de estar separado en dos zonas mediante un banco de acero inoxidable que separa la “zona sucia”, donde se realizará el cambio de vestuario y, la “zona limpia” donde estaremos en disposición de acceder a las Salas de Producción en grado B (figura 13).

Al entrar, se retirarán otro par de calzas siguiendo el procedimiento descrito y evitando pisar el suelo del Vestuario B con la misma calza que estuvo en contacto con el suelo del Vestuario C.

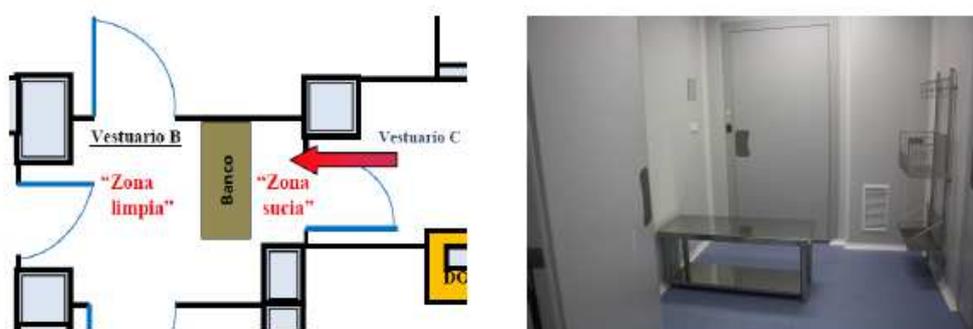


Figura 13. Plano e imagen del Vestuario B. Detalle del banco de acero inoxidable que separa la zona sucia y zona limpia.

Material y Métodos

Ya en la “zona sucia”, se asepticará el banco con alcohol al 70% (Klercide 70/30 Denatured Ethanol. Ecolab Contamination Control, UK) y toallitas estériles sin costuras de baja liberación de partículas (Bioclean Oryx™. Nitritex Ltd., UK).

A continuación, se eliminará la envuelta externa del traje integral estéril compatible con clase ISO 4 (Bioclean-D™, Coverall with Hood. Nitritex Ltd., UK), los cubre botas (Bioclean-D™. Disposable Overboots. Nitritex Ltd., UK) y los guantes estériles (Mediguard Surgical Gloves. Medline Industries, Inc. Mundelein, Illinois, USA de un solo uso y se depositarán sobre el banco.

Se colocará el traje integral estéril siguiendo los siguientes pasos:

- con cuidado de no rasgar ni manosear la superficie externa del traje, se abrirá tocando exclusivamente la cremallera con una mano y sujetándolo por la parte superior. Una vez abierto, se sujetará por el interior del mismo a la altura de la cintura, recogiendo posteriormente la parte más distal de las mangas y de las perneras, cuidando de que el traje no entre en contacto en ningún momento con paredes ni suelo;
- se introducirá una de las piernas en una de las perneras del traje y, posteriormente, la otra;
- se subirá el mono tocándolo por el interior hasta la altura de la cintura, donde se introducirán los brazos en cada una de las mangas;
- frente al espejo se colocará la capucha, comprobando que cabellos y barba, en su caso, quedan debidamente cubiertos. Se subirá la cremallera y cerrará el velcro.

Seguidamente, nos sentaremos en el banco para realizar las siguientes operaciones:

- levantando una pierna y sin tocar el suelo, se colocará uno de los cubre-botas o polainas. Se pasará esta pierna por encima del banco y pisará en la “zona limpia”. Se repetirá la operación con la otra pierna.
- una vez de pie en la zona limpia del Vestuario B, nos colocaremos (sobre los anteriores) el segundo par de guantes estériles, que se ajustaran sobre las mangas del mono.

Finalizada esta etapa, se está en disposición de acceder a las Salas de Producción.

El uso de doble par de guantes estériles fue objeto de debate en la UPC ya que reduce la movilidad y sensibilidad, al tiempo que provoca una mayor fatiga en las manos durante la manipulación de utensilios. Aún así, existe un elevado riesgo de rotura de guantes al manipular diferentes objetos y equipos, y se sabe que este riesgo aumenta con el tiempo durante el que son utilizados [97]. De hecho, durante su uso, se producen a menudo micro perforaciones que pasan desapercibidas y que resultan en una pérdida de la barrera protectora que permite el paso de bacterias [98]. Se establece un período máximo de uso de guantes de 90 minutos, transcurridos los cuales, se retornará al Vestuario B para su sustitución.

4.1.3.b. Salida de personal

Dado que no se manipulan tejidos ni cultivos celulares con potenciales agentes biológicos infecciosos y que el fin de la instalación y de los procedimientos implantados es la protección de los productos fabricados, la salida del personal se realiza pasando desde las zonas de mayor clasificación a las de menor, sin despojarse de ninguna prenda. Ya en el exterior del área clasificada se procede a la retirada de guantes, mascarilla, traje integral protector, popelín y zuecos.

4.1.3.c. Flujo de materiales y residuos

4.1.3.c.1. Introducción de materiales al Almacén GMP (grado D)

Los materiales que van a ser utilizados exclusivamente en la fabricación de medicamentos o en la limpieza de la instalación, una vez aprobados [21], son introducidos en el Almacén grado D (figura 14). Para ello, los materiales son previamente asepticados preferentemente con esporicidas, quedando totalmente prohibido el acceso de papel o cartón a la instalación debido al riesgo que suponen por ser fuente de hongos y esporas [99].



Figura 14. Detalle del Almacén GMP (grado D)

4.1.3.c.2. Introducción de materiales a las Salas de Producción

El flujo de entrada y salida de materiales está diseñado para minimizar el riesgo de contaminación desde las áreas más sucias (Grado D) a las más limpias (Grado A/B).

Todos los materiales, herramientas o equipos de pequeño tamaño que se vayan a introducir en el interior de las áreas clasificadas, lo hacen a través de los SAS pasamateriales de entrada que comunican el Distribuidor con las Salas de Producción.

El procedimiento implantado consiste en la asepticación del material con biocidas y limpieza por arrastre usando toallitas de baja liberación de partículas, para posteriormente ser introducidos en el SAS pasamateriales donde se realiza un ciclo de

Material y Métodos

desinfección UV. En este punto, se han considerado críticos algunos aspectos tales como la limpieza inicial de la superficie del SAS, y el hecho de que la luz UV sólo desinfecta en los lugares donde incide, siendo ineficaz en los “lugares de sombra”. Por ello, se tiene especial cuidado en no sobrecargar los SAS y rotar, al menos 2 veces, los materiales con el fin de aumentar la eficacia UV. La capacidad germicida de las lámparas UV se comprueba anualmente dentro del Plan de Control de la Biocontaminación Ambiental (Cualificación Microbiológica Anual).

La excepción a este procedimiento son aquellos materiales fabricados para uso exclusivo en salas blancas como los biocidas y placas para el control ambiental que se suministran con triple envoltorio de plástico, de manera que para introducirlos en el SAS tan sólo se despojan del envoltorio exterior, haciendo innecesaria la desinfección y limpieza con toallitas.

4.1.3.c.3. Salida de materiales

Todos los residuos son retirados de las Salas de Producción a través de los SAS pasamateriales de salida que comunican estas salas con el distribuidor. El tratamiento de los residuos generados se ajusta al Plan de Eliminación de Residuos suscrito por el Hospital.

En el caso de que se haya procedido al alicuotado de medios en los correspondientes tubos estériles, éstos se introducirán en bolsas unitarias estériles (Twist-Seal, VWR Collection, Pennsylvania, USA) en el interior de las CFL, para posteriormente salir por los SAS pasamateriales y ser almacenados en la cámaras refrigeradoras situadas en el Almacén GMP o en el laboratorio de Control de Calidad.

4.2. OBJETIVO 1. DEMOSTRAR LA IDONEIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y MÉTODOS DE MUESTREO PARA LA MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DEL ÁREA CLASIFICADA Y LA VERIFICACIÓN DE LA ESTERILIDAD DE LOS MEDICAMENTOS FABRICADOS.

4.2.1. Medios de cultivo utilizados en los controles microbiológicos

Se utilizaron medios de cultivo no selectivos con base de Trypticase Soja Agar y medios específicos suplementados con dextrosa para favorecer la promoción de crecimiento de hongos filamentosos y levaduras.

Todas las placas se presentan triple-embolsadas, con lo que se permite la eliminación sucesiva de envueltas conforme se accede a zonas de mayor clasificación ambiental, e irradiadas por lo que se asegura la esterilidad del medio, de las superficies de plástico externas y de las bolsas acondicionadoras internas, tal y como se recomienda en la norma ISO 14698-1 [2].

4.2.1.a. Agar Trypticase de Soja 3P™ Irradiado (TSA3, ref 43711. BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

Las placas de agar TSA3 (figura 15) se utilizan para realizar los muestreos volumétricos de aire (muestreo activo de partículas viables) y muestreo por sedimentación de partículas viables (muestreo pasivo). Poseen un diámetro de 90 mm que satisface las exigencias recogidas en el Anexo 1 de las NCF. Su composición es acorde a los requisitos establecidos en el capítulo 2.6.13 de la Farmacopea Europea [100].



Figura 15. Placa de agar TSA3

4.2.1.b. Agar irradiado Count-Tact™ 3P (CT3P, ref 43691 BioMérieux)

Las placas de agar CT3P se utilizan para realizar los controles de superficie. Poseen un diámetro de 55 mm que satisface las exigencias recogidas en el Anexo 1 de las NCF.

En este caso, el agar TSA, se envasa en un tipo especial de placa de Petri, denominada placa RODAC (Replicate Organisms Direct Agar Contact) (figura 16). Este tipo de placa, una vez que se rellena con la cantidad suficiente de medio, crea una superficie ligeramente convexa que permite la aplicación del medio, mediante presión, sobre la

Material y Métodos

superficie a muestrear y por tanto, la recuperación de partículas viables directamente de las superficies muestreadas.



Figura 16. Placa de contacto tipo RODAC CT3P

En su composición, se adicionan cuatro agentes neutralizantes con el fin de evitar que restos de desinfectantes (que quedan en las superficies tras los procedimientos de limpieza y aseptización) con actividad antibacteriana puedan inhibir o dificultar la recuperación de los microorganismos [2]. Su composición es acorde a los requisitos establecidos en el capítulo 2.6.13 de la Farmacopea Europea [100].

La combinación de lecitina, polisorbato 80 y L-histidina neutraliza los aldehídos y fenoles; la combinación de lecitina y polisorbato 80 neutraliza los compuestos de amonio cuaternario; el polisorbato 80 neutraliza el hexaclorofeno y los derivados del mercurio; el tiosulfato sódico neutraliza los compuestos halogenados, y la lecitina neutraliza la clorhexidina.

Por otro lado, la base de plástico de la placa está dividida en cuadrículas para facilitar el recuento de microorganismos en aquellos ambientes con mayor nivel de contaminación.

4.2.1.c. Sabouraud Dextrosa 3P con neutralizantes, irradiado (SN3P, ref. 43814 BioMérieux)

Las placas de medio SN3P se utilizan para monitorizar la biocontaminación ambiental mediada por hongos filamentosos y levaduras. Estas placas se utilizaron inicialmente junto con las placas de TSA3 en los controles de biocontaminación activo (muestreo volumétrico de aire) y pasivo (sedimentación de partículas viables) e impronta de guantes. Poseen un diámetro de 90 mm que satisface las exigencias recogidas en el Anexo 1 de las NCF y, al igual que las CT3P, poseen agentes neutralizantes.

Su composición es acorde a los requisitos establecidos en el capítulo 2.6.13 de la Farmacopea Europea [100]. En su elaboración, el pH se ajusta a $5,6 \pm 0,2$ a 25°C que favorece el crecimiento de hongos e inhibe ligeramente el crecimiento bacteriano [101].

4.2.1.d. Agar Count-Tact™ Sabouraud Dextrosa con neutralizantes, irradiado (SC3P, ref. 43812 BioMérieux)

Las placas de agar SC3P se utilizaron inicialmente junto con las placas de CT3P en los controles de biocontaminación de superficies. Poseen un diámetro de 55 mm que satisface las exigencias recogidas en el Anexo 1 de las NCF.

Al igual que las placas CT3P, el medio nutritivo se envasa en placas de Petri tipo RODAC que permite la aplicación del medio, mediante presión, sobre la superficie a muestrear y por tanto, la recuperación de partículas viables directamente de las superficies muestreadas.

Su composición es acorde a los requisitos establecidos en el capítulo 2.6.13 de la Farmacopea Europea [100]. En su elaboración, el pH se ajusta a $5,6 \pm 0,2$ a 25°C que favorece el crecimiento de hongos e inhibe ligeramente el crecimiento bacteriano [101].

4.2.1.e. Caldo de Trypticasa de soja (TSB, BioMérieux)

El medio TSB es un medio líquido nutritivo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, especialmente bacterias aerobias, anaerobias facultativas y algunos hongos. Debido a su capacidad para favorecer el crecimiento, esta fórmula fue adoptada por la Farmacopea Americana (USP), la Farmacopea Europea (Eur. Ph.) y la Japonesa (JP).

El medio TSB se utiliza para realizar los controles de contaminación (bioburden) a partir de diferentes tipos de muestras y en los procedimientos de validación de los procesos de fabricación aséptica de medicamentos o *Media Fill*. En este trabajo, se utilizó también para sembrar las muestras tomadas del agua utilizada para mantener las condiciones de humedad en el interior de los incubadores de CO₂ y en el baño termostático utilizado para la descongelación de suspensiones celulares criopreservadas y de suplementos de medio de cultivo celular (agua estéril y apirógena, de calidad inyectable de Laboratorios Grifols Movaco S.A, Barcelona).

Su composición es acorde a los requisitos establecidos en el capítulo 2.6.13 de la Farmacopea Europea [100].

4.2.1.f. Caldo Tioglicolato (Tubos THIO, Francisco Soria Melguizo, Madrid, España)

El medio THIO es un medio líquido nutritivo preparado específicamente para pruebas de control de esterilidad, principalmente para el cultivo de microorganismos de difícil crecimiento y microorganismos de crecimiento rápido entre los que se incluyen bacterias aerobias, anaerobias y microaerófilos por la adición de un agente reductor y pequeñas cantidades de agar. La presencia de agar en pequeña proporción retarda la difusión del oxígeno en el medio, además la presencia de L-cistina y Tioglicolato sódico ayudan a la eliminación del oxígeno libre evitando la formación de Peróxido de

Material y Métodos

Oxígeno, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos anaerobios. Además el Tioglicolato sódico neutraliza los efectos bacteriostáticos. Los microorganismos aerobios estrictos crecen en la parte superior del tubo y los anaerobios crecen en la profundidad del medio. En este trabajo se usó para determinar la reproducibilidad del ensayo de esterilidad por el método tradicional facilitando el crecimiento de microorganismos anaerobios estrictos (*Clostridium sporogenes*).

Su composición también es acorde a los requisitos establecidos en el capítulo 2.6.13 de la Farmacopea Europea [100].

4.2.1.g. Medios líquidos de crecimiento microbiológico para la validación del ensayo de esterilidad en sistemas automatizados

Se utilizaron los siguientes viales de medio de cultivo microbiológico cualitativo (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), compuestos de caldo digerido de soja caseína, diseñados para la recuperación de microorganismos (bacterias y levaduras) en sangre:

- Frascos de cultivo BACTEC Plus Aerobic/F
- Frascos de cultivo aeróbico BACTEC Peds Plus/F
- Frascos de cultivo BACTEC Lytic Anaerobic/F

Todos los medios BACTEC se suministran con CO₂ añadido. Los medios anaerobios se pre reducen y se dispensan con CO₂ y N₂. Los frascos aerobios poseen resinas con el fin de neutralizar la actividad antimicrobiana de los posibles restos de antibiótico que puedan existir en la muestra [102- 104]. Adicionalmente, todos los frascos llevan polianetol sulfonato sódico (SPS) como agente neutralizante y otros componentes (tabla 9).

Ingredientes	Plus Aerobic/F % (p/v)	Peds Plus/F % (p/v)	Lytic Anaerobic/F % (p/v)
Agua tratada	30 ml	40 ml	40 ml
Caldo digerido de soja-caseína	3,0%	2,75%	2,75%
Extracto de levadura	0,25%	0,25%	0,2%
Digerido de tejido animal	-	0,10%	0,05%
Aminoácidos	0,05%	-	-
Hemina	-	0,0005%	0,0005%
Menadiona	-	0,00005%	0,00005%
Dextrosa	-	0,06%	0,2%
Sacarosa	-	0,08%	
Citrato sódico	-	-	0,02%
Tioles	-	-	0,1%
Piruvato de sodio	-	0,10%	0,1%
Saponina	-	-	0,26%
Polianetol sulfonato sódico (SPS)	0,05%	0,020%	0,035%
Agente antiespumante	-	-	0,01%
Vitaminas	0,025%	Vit. B6 0,001%	-
Antioxidantes/reductores	0,005%	-	-

Material y Métodos

Resina adsorbente no iónica	13,4%	10%	-
Resina de intercambio catiónico	0,9%	0,6%	-

Tabla 9. Composición de los diferentes frascos de cultivo utilizados en el ensayo de esterilidad.

4.2.2. Control de calidad de medios de cultivo. Ensayos de promoción de crecimiento.

Con el fin de verificar el rendimiento de los medios líquidos y sólidos utilizados, se realizaron ensayos de promoción de crecimiento con cepas comerciales (BioBall™, MultiShot 550 mixed kit, BTF, Biomerieux) de los microorganismos establecidos en la Farmacopea para este tipo de ensayos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis/niger* ATCC 16404.

Como medio de rehidratación para la realización de alícuotas se usó un fluido de rehidratación (14 Days Rehydration Fluid™, BTF, Biomerieux). Se resuspendió cada cepa en un vial de fluido de rehidratación de 1,1 ml. A partir de ahí se tomaron alícuotas de 100 µl. La rehidratación de cepas e inoculación de medios se realizó en cabina de seguridad biológica en el Laboratorio de Control de Calidad.

4.2.2.a. Promoción de crecimiento en medios sólidos

Para cada ensayo de promoción de crecimiento, se inoculó una cantidad inferior a 100 unidades formadoras de colonias (ufc) por placa de cada una de las cepas anteriores adquiridas comercialmente. La siembra del inóculo se realizó con Asas de Digralsky en cada tipo de placa, con el fin de favorecer la dispersión de los microorganismos en toda la superficie de agar.

4.2.2.b. Promoción de crecimiento en medio líquido TSB

Para cada ensayo de promoción de crecimiento, se inoculó una cantidad inferior a 100 ufc de los microorganismos indicados, diluidos en solución salina estéril. Las condiciones de incubación se muestran en la tabla 10.

Microorganismo	Recuento de aerobios, hongos y levaduras
<i>S. aureus</i>	Trypticasa de soja caldo (TSB) o agar (TSA); 30-35 °C ≤ 3 días
<i>P. aeruginosa</i>	
<i>B. subtilis</i>	
<i>C. albicans</i>	Sabouraud dextrosa agar; 20-25 °C ≤ 5 días, ó Trypticasa de soja agar (TSA); 30-35 °C ≤ 5 días, ó Trypticasa de soja caldo (TSB) 30-35 °C ≤ 5 días
<i>A. niger</i>	

Tabla 10. Condiciones de incubación para la realización de los ensayos de promoción de crecimiento en medios sólidos y líquidos.

Material y Métodos

Criterios de aceptación (Ph. Eur 2.6.12.):

- *Medios sólidos:* El crecimiento obtenido no debe diferir de un factor mayor a 2 calculado a partir del valor del inóculo.

$$ufc recuperadas = ufc sembradas \pm \frac{ufc sembradas}{2}$$

- *Medios líquidos:* Se observa crecimiento visible a simple vista (turbidez del medio).

4.2.2.c. Promoción de crecimiento para aprobación del lote de frascos de cultivo microbiológico utilizados para ensayo de esterilidad

Tras la última inspección de la AEMPS, se nos requirió realizar un ensayo de promoción de crecimiento para la aprobación de cada nuevo lote de frascos de cultivo microbiológico Peds Plus /F y Lytic Anaerobic/F.

Para ello, se utilizaron cepas comerciales con 30 ufc (BioBall™ SingleShot mixed kit for Sterility Assurance Testing, BTF, Biomerieux) de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Clostridium perfringens*.

En el medio aerobio Peds Plus /F: se utilizaron inóculos de 15 ufc y 30 ufc de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*:

- inóculos de 15 ufc, se diluyeron las cepas en 1 ml de agua destilada, tras homogeneizar la suspensión, se inocularon 0,5 ml de cada cepa en un frasco utilizando jeringas y agujas estériles.
- inóculos de 30 ufc, se diluyeron las cepas en 1 ml de agua destilada, tras homogeneizar la suspensión, se inoculó al completo utilizando jeringas y agujas estériles.

En el medio anaerobio Lytic Anaerobic/F: se utilizaron inóculos de 15 ufc y 30 ufc de cepas de *Clostridium perfringens* preparados igual que los anteriores.

Los frascos inoculados se introdujeron entonces en el sistema Bactec FX para su incubación durante 7 días a 30-35°C. Los criterios de aceptación fueron que se detectara crecimiento en los frascos antes de completar los 7 días de incubación.

4.2.3. Efecto de la deshidratación sobre placas de TSA utilizadas para los muestreos volumétricos de aire y sedimentación de partículas

Las condiciones ambientales del ensayo en las zonas de Grado A (cabinas de flujo laminar) de la UPC fueron 38-40% de humedad relativa y 0,42 m/s de velocidad del flujo de aire laminar (rango aceptado 0,36 a 0,54 m/s [39]).

Se utilizaron placas de agar TSA3 que, tras su exposición, fueron incubadas a 30-35°C durante 3 días.

En primer lugar, con el fin de deshidratar las placas, se expusieron a un proceso de muestreo real de 4 horas, 6 horas y 8 horas en el interior de cabinas de flujo laminar. A continuación, estas mismas placas se trasladaron a un ambiente no clasificado (zona administrativa y laboratorio de control de calidad) y se expusieron durante 2 horas adicionales junto con una placa no deshidratada a modo de control. Se eligieron 10 puntos para cada uno de los tiempos de deshidratación testados.

Adicionalmente, en cada uno de los tiempos de deshidratación (4, 6 y 8h) se colocó una placa a modo de control negativo del procedimiento de deshidratación en el interior de la cabina de flujo laminar. Estas placas no fueron sometidas a su exposición posterior en un ambiente no clasificado, y fueron utilizadas para descartar la contaminación de las placas durante su deshidratación en grado A, de forma que pudiéramos asegurar que los microorganismos recuperados en el resto de las placas procedían de la posterior exposición al ambiente no clasificado.

Las diferencias entre las placas deshidratadas y las no deshidratadas para cada tiempo se analizaron con el test no paramétrico de Mann-Whitney.

4.2.4. Capacidad de las placas utilizadas para los controles de superficies de neutralizar los agentes desinfectantes

Para comprobar el efecto de los residuos de los agentes desinfectantes utilizados en los procesos de limpieza y desinfección sobre la capacidad de promoción de crecimiento de las placas de contacto Count-Tact™ 3P (CT3P, BioMérieux) y la capacidad neutralizante de las mismas, se utilizaron los siguientes desinfectantes:

Biocida AQ [Klercide Sporicidal Chlorine, anteriormente denominado Klercide Biocida B (Shield Medicare Ltd, Farnham, UK)]. Es una solución estéril de dióxido de cloro estabilizado y un compuesto de amonio cuaternario.

Eficacia

Material y Métodos

Bactericida EN 1276	Fungicida EN 1650	Bactericida y Fungicida EN13697	Esporicida EN 13704
------------------------	----------------------	------------------------------------	------------------------

Biocida PH [Klercide Sporicidal Low Residue Peroxide, anteriormente denominado Klercide-CR Biocida C (Shield Medicare Ltd)]. Es una solución estéril de 6% de peróxido de hidrógeno en agua desionizada.

Eficacia

Bactericida EN 1276	Fungicida EN 1650	Bactericida y Fungicida EN13697	Esporicida EN 13704	Virucida EN 14476
------------------------	----------------------	------------------------------------	------------------------	----------------------

Biocida AH [InSpec™ HA Premium (Redditch Medical, Sedgefield, UK)]. Solución estéril de ácido hipocloroso en agua de calidad inyectable.

Eficacia

Bactericida EN 1276	Fungicida EN 1650	Bactericida y Fungicida EN13697	Esporicida EN 13704
------------------------	----------------------	------------------------------------	------------------------

Etanol 70% [Klercide 70/30 denatured ethanol (Shield Medicare Ltd)]. Solución estéril de etanol al 70% en agua desionizada.

Eficacia

Bactericida EN 1276	Fungicida EN 1650	Bactericida y Fungicida EN13697
------------------------	----------------------	------------------------------------

Isopropanol 70% [Sterile IPA (Texwipe, Kernersville, NC, USA)]. Solución estéril formada por 70% alcohol isopropílico grado USP en 30% agua purificada grado USP.

Eficacia

Bactericida EN 1276	Fungicida EN 1650	Bactericida y Fungicida EN13697
------------------------	----------------------	------------------------------------

Todos los desinfectantes utilizados son estériles por filtración de 0,2 µm, están sometidos a irradiación gamma (salvo el Biocida AH) y se suministran doble embolsados en grado A.

Se procedió a rociar una superficie de acero inoxidable (bandeja superior del carro ubicado en el Distribuidor del área clasificada) con cada uno de los biocidas. Se esperó un tiempo de 15 minutos hasta la completa evaporación del producto. A continuación, se expuso la superficie de agar de las placas durante 10 segundos a la superficie que contenía los restos de biocida.

Finalmente, con estas placas se procedió a realizar ensayos de promoción de crecimiento con cepas establecidas en la Farmacopea Europea [105]: cepas comerciales de microorganismos BioBall™ Single Shot de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (media de 28-33 ufc/lote y desviación

Material y Métodos

estándar ≤ 3 ufc), y de *Apergillus brasiliensis/niger* (media de 28-33 ufc/lote y desviación estándar de 4-5 ufc) (BTF. BioMérieux).

Adicionalmente, se utilizaron dos especies aisladas en los controles ambientales de superficies (*Kocuria rhizophila* y *Micrococcus luteus*) con el fin de verificar el efecto sobre los microorganismos habitualmente encontrados en la instalación. Los inóculos de *Kocuria rhizophila* se prepararon a partir de cepas comerciales Bioball™ SingleShot (media de 38-40 ufc y desviación estándar ≤ 3 ufc), mientras que las suspensiones de *Micrococcus luteus* se prepararon a partir de cepas aisladas en los controles ambientales realizados en la UPC.

Todas las placas se incubaron a 30-35°C menos de 3 días.

Las diferencias en la promoción del crecimiento de los microorganismos entre las placas en contacto con los residuos de los desinfectantes y la placa control se analizaron con el test no paramétrico de Mann-Whitney.

4.2.5. Técnicas de muestreo microbiológico ambiental

La toma de muestras para el control de la biocontaminación ambiental se realizó mediante las siguientes técnicas de muestreo:

4.2.5.a. Muestreo volumétrico de aire (muestreo activo de aire)

La toma de muestras para los controles volumétricos de aire se realizó utilizando el muestreador de impacto de aire MAS-100 Eco (Merck & Co., Whitehouse Station, New Jersey). Este equipo aspira un volumen de aire preseleccionado a través de una tapa perforada siguiendo el principio de impactación de Anderson [106]. El flujo de aire generado por un ventilador radial se controla a tiempo real mediante un sensor de flujo para mantener un caudal constante de 100 litros/minuto. El aire aspirado es impactado en la superficie de una placa de Petri de 90 mm de diámetro que contiene el medio de cultivo apropiado.

Con el uso del muestreador MAS-100 Eco, la velocidad de impacto de los microorganismos sobre la superficie de agar es de aproximadamente 11 m/s que coincide con el nivel 5 del muestreador de Anderson [106]. Tanto el muestreador de aire como el cabezal del mismo se aseptizan con alcohol 70% y posterior limpieza con toallita estéril. Finalmente se somete a radiación UV en los SAS pasamateriales antes de ser introducidos en el área clasificada. Esta aseptización sólo se realiza una vez antes de cada control completo de la instalación ya que el orden de muestreo es siempre de zonas de grado A hacia las zonas de grado D y por tanto la contaminación residual entre muestreos se considera despreciable.

El volumen de muestra en todos los casos fue de 1 m³ de aire (1000 litros) y no se utilizó el modo “retardo” en la configuración del equipo. Las muestras se tomaron en condiciones reales de trabajo; siendo, en ocasiones, tomadas cuando uno o varios

Material y Métodos

operarios del departamento de producción realizaban o habían realizado sus tareas en la instalación.

Para la lectura y recuento del número de ufc obtenidas tras el periodo de incubación, se tuvo en cuenta la corrección estadística de Feller (1950) [107]. Este método se basa en el principio de que a mayor cantidad de microorganismos en un volumen de aire determinado, aumenta la probabilidad de que penetren varios de ellos por el mismo orificio del cabezal y puedan subestimarse los recuentos bacterianos. La tabla de corrección se muestra como anexo I.

4.2.5.b. Muestreo por sedimentación de partículas (muestreo pasivo de aire)

Se realizó mediante la exposición al ambiente de la superficie de agar de placas de Petri de 90 mm de diámetro. Debido a que este método de muestreo no interfiere con el flujo de aire laminar propio de las CFL fue el método de elección para la monitorización de procesos en grado A. El tiempo de exposición fue variable, aunque en ningún caso fue superior a 4 horas, dependiendo fundamentalmente de la duración de las actividades realizadas en grado A.

Las placas se colocaron en la superficie de trabajo, próximas al área de manipulación del producto en las operaciones realizadas en grado A y a nivel del suelo en el resto de localizaciones.

4.2.5.c. Control de superficies, equipos y personal

El muestreo de superficies se realizó mediante el método de placas de contacto tipo Rodac (Count-Tact®, BioMérieux). Se abrieron las placas y, colocando el medio nutritivo hacia la superficie a muestrear, y se ejerció una ligera presión durante 10 segundos [108] [109] [110] tras los cuales se retiró y cerró la placa. Los restos de medio nutritivo adheridos a la superficie muestreada se retiraron con toallitas desechables estériles aptas para su uso en grado A (BioClean Oryx™, Nitritex) y alcohol 70%.

En cuanto al tiempo de contacto establecido en el muestreo se ha tenido en cuenta la indicado en la norma UNE-ISO 18593:2013 que recomienda un tiempo de contacto de 10 segundos [111].

En el interior de las Salas de Producción (grado B) donde se encuentran situadas las cabinas de flujo laminar (grado A), la metodología de muestreo fue la siguiente:

- primero se tomaron las muestras del interior de las cabinas. Tras la toma de muestra de cada cabina se procedió a la limpieza de los restos de medio nutritivo con las toallitas indicadas anteriormente. Esta toallita fue desechada. De esta forma se minimizó la posibilidad de transferir partículas entre ambientes de grado A (contaminación cruzada);
- en segundo lugar se tomaron las muestras del resto de puntos de la sala (grado B), siempre desde las zonas previsiblemente más limpias hasta las más sucias, en el

Material y Métodos

siguiente orden: paredes, estanterías, superficies de trabajo, mobiliario y materiales, equipos, suelos y retornos en su caso. En esta segunda fase del muestreo las toallitas se utilizaron para limpiar los restos de medio procedentes de varios puntos de muestreo respetando el orden indicado.

El resto de dependencias (grados C y D) se muestrearon observando estas precauciones, y muestreando las diferentes salas por el siguiente orden: Vestuario B, Vestuario C, Almacén, Distribuidor y Vestuario D.

Los *controles de personal* se realizaron mediante la utilización del mismo tipo de placas. Se muestrearon dos puntos de la superficie corporal (antebrazo y hombro) del personal que habitualmente realiza sus operaciones en el interior del área clasificada (operarios de limpieza, personal de producción y calidad de la UPC) tras la colocación del mono y guantes estériles, a fin de comprobar la idoneidad y seguimiento de los procesos de entrada y vestimenta a la zona clasificada.

4.2.5.d. Impronta de guantes

Tras la finalización de operaciones críticas en grado A, se abrió una placa de petri de 90 mm y se presionó ligeramente durante 10 segundos con las yemas de los cinco dedos de una de las manos sobre la superficie del agar, repitiendo la operación, en otra placa diferente, con la otra mano. Finalmente se aseptizaron las manos enguantadas con alcohol 70% y se secaron para eliminar los restos de medio nutritivo.

4.2.5.e. Control de contaminación del agua de incubadores de CO₂ y baño termostático

Se tomaron 2 ml del agua de la bandeja de los incubadores de CO₂ en grado B y del baño termostático en el laboratorio de control de calidad, y se transfirieron 0,9 ml a cada uno de los dos tubos de TSB de 9 ml (BioMérieux). Uno de los tubos procedentes de cada equipo se incubó a 20-25°C durante 7 días. El otro se incubó a 30-35°C el mismo periodo de tiempo, transcurrido el cual, se evaluó macroscópicamente la turbidez del medio en comparación con un tubo control (tubo estéril de TSB al que no se había añadido agua).

4.2.5.f. Evolución de las técnicas y condiciones de cultivo microbiológico en la Unidad de Producción Celular HRU de Málaga

Es imperativo que la implantación del Plan de Control de la Biocontaminación se adapte al tipo de medicamento fabricado (en nuestro caso, medicamentos estériles basados en terapia celular), a la instalación en la que son fabricados y a las condiciones específicas de los procesos de fabricación.

En este sentido, los medios y condiciones de cultivo utilizados fueron progresivamente adaptados al proceso productivo, la instalación y, especialmente al conocimiento en base a la experiencia adquirida a partir de los resultados obtenidos hasta el momento.

Material y Métodos

Cada cambio de medio y condiciones de incubación fueron validadas previamente a su inclusión en el Plan de Control de la Biocontaminación (tabla 11).

	Inicio (Octubre 2011)	A partir de Febrero 2012
Medios utilizados	TSA y Sabouraud	TSA
Condiciones incubación	TSA: 30-35 °C / 3 días Sabouraud: 20-25 °C / 5 días	20-25 °C / 3 días + 30-35 °C / 2 días

Tabla 11. Cambio en los medios y condiciones de cultivo

4.2.5.g. Condiciones de cultivo iniciales: uso conjunto de placas de TSA y Sabouraud. Octubre 2011.

El control de la Biocontaminación en nuestra UPC se inició con este tipo de placas con el fin de aislar bacterias en las placas de TSA y hongos en las placas de Sabouraud. En cuanto a las condiciones de tiempo y temperatura de incubación, no existen unos parámetros estrictamente definidos en las normas aplicables al control microbiológico ambiental en ambientes controlados (Ph. Eur. 2.6.12, USP <1116> e ISO 14698-1); en la tabla 12 se muestran algunas de las recomendaciones. La pauta común es el establecimiento de unas condiciones generales y a partir de ellas cada laboratorio debe establecer sus propios rangos dependiendo de las características de las especies microbianas esperadas. No se establecen condiciones de cultivo en anaerobiosis ya que en los controles realizados (ambientales) no se espera la presencia de este tipo de microorganismos.

Ph. Eur (2.6.12)	USP <1116>	ISO 14698-1
Bacterias aerobias o anaerobias facultativas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus subtilis</i>): TSA 30-35 °C ≤ 3 d Levaduras y hongos filamentosos (<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>): TSA 30-35°C ≤ 5 d 6 Sabouraud 20-25°C ≤ 5 d	TSA 20-35 °C ≥ 72 horas. Recomendaciones: Tiempos de incubación superiores si se conoce que los contaminantes pueden ser de crecimiento lento. En ausencia de evidencias confirmadas, se podría incubar cada placa a dos temperaturas diferentes; siendo, la primera incubación, a bajas temperaturas. Este régimen de incubación puede comprometer la recuperación de cocos Gram positivos (normalmente asociados con humanos).	Periodos de incubación de 2 a 5 días para bacterias y 5 a 7 días para hongos. Temperatura seleccionada según el tipo de microorganismos esperado.

Tabla 12. Condiciones de cultivo establecidas en las diferentes normas consultadas.

En base a esta información, al iniciar la andadura de nuestra UPC se utilizaron placas de TSA y Sabouraud en cada punto de muestreo, con las siguientes condiciones de incubación:

Material y Métodos

<i>Medio base</i>	<i>Medio cultivo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
TSA agar	TSA3 y Placas de contacto CT3P	30-35 °C	3 días
Sabouraud	SN3P y Placas de contacto SC3P	20-25 °C	5 días

El número total de microorganismos aerobios se considera igual al número de ufc recuperadas en medio TSA agar; si se observan colonias de hongos en este medio, son contadas como parte del número total de microorganismos aerobios. El número total de hongos y levaduras se considera igual al número de ufc aisladas en medios de Sabouraud dextrosa agar, si se aprecia el crecimiento de bacterias en este medio, son contadas como parte del número de total de hongos y levaduras [105].

Para obtener un valor comparable a lo establecido en las NCF, cuando se utilizaron placas de TSA y Sabouraud en cada punto de muestreo, se calculó el valor medio de los resultados obtenidos en cada punto por ambas placas. Así, por ejemplo, en los muestreos volumétricos de aire, se tomó una muestra de 1 m³ de aire con la placa de TSA y otra muestra de 1 m³ de aire con la placa de Sabouraud y se dividió por 2 el número total de ufc obtenidas en ambas placas. En el caso de los muestreos por sedimentación, se expusieron ambas placas durante aproximadamente 4 horas y el número total de ufc recuperadas se dividió por 2. En los muestreos de superficies mediante placas de contacto, se tomaron 2 muestras próximas entre sí, cada una con un tipo de placa (50 cm² en total) y el número total de ufc recuperadas se dividió por 2.

4.2.5.h. Supresión del uso de placas de Sabouraud. Febrero 2012.

En base a la experiencia acumulada hasta febrero de 2012, se procedió a validar el cambio de las condiciones de cultivo con el fin de suprimir el muestreo con medio Sabouraud. Los motivos principales fueron:

- la finalidad de los medios TSA y Sabouraud es el aislamiento preferencial aunque no selectivo de microorganismos. Se observó que, en ambientes de mayor contaminación de partículas viables (grado D), los hongos eran recuperados tanto en las placas de Sabouraud como en las de TSA y en las placas de Sabouraud también crecieron bacterias confirmando que no es un medio estrictamente selectivo para hongos.
- levaduras y hongos son susceptibles de crecer en medios con base de caseína de soja y son usados para realizar ensayos de promoción de crecimiento (European Pharmacopoeia 2.6.12). Los ensayos de promoción de crecimiento proporcionados por el fabricante de dichas placas así lo acreditan.
- el fin del muestreo ambiental es determinar si el número de unidades formadoras de colonias (ufc) sobrepasa los límites establecidos en el Anexo 1 de las NCF independientemente del tipo de colonia. Bien es cierto que el conocimiento de la microbiota residente es importante, pero no es el criterio establecido en las NCF;

Material y Métodos

- en cuanto a los muestreos volumétricos de aire, la toma de muestras supone el muestreo de 2000 litros de aire (2m³) en cada punto (1000 litros de aire para la placa de TSA y 1000 litros de aire para la placa de Sabouraud). Pueden utilizarse métodos de muestreo simplificado (500 litros en cada punto y corrección con factor de 2 por ejemplo) pero no se consideraron apropiados ya que aumentan la imprecisión del método.

Se consideró implantar unas condiciones de incubación próximas a las recomendaciones establecidas en la Farmacopea Europea [105] y a la norma ISO 14698-1 con un tiempo total de 5 días y, siguiendo las recomendaciones de la USP y lo descrito por Sandle y cols. [112], se comenzó el periodo de incubación con la temperatura más baja:

Medio base	Medio cultivo	1ª incubación	2ª incubación
TSA agar	TSA3 y Placas de contacto CT3P	20-25 °C 3 días	30-35 °C 2 días

Las condiciones de crecimiento se evaluaron con el uso de placas TSA3 de 90 mm. No se utilizaron placas de CT3P de 55 mm por motivos de facilidad en el manejo y siembra de microorganismos; la composición de ambos tipos de placas es la misma a excepción de los agentes neutralizantes presentes en las placas CT3P.

Se utilizaron cepas comerciales (BioBall™, MultiShot 550 mixed kit, BTF, Biomerieux) de los microorganismos establecidos en la Farmacopea Europea [105] para los ensayos de promoción de crecimiento: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Aspergillus brasiliensis/niger* (ATCC 16404)

Para obtener las condiciones óptimas de cultivo se usaron estufas cualificadas y monitorizadas a 20-25 °C (estufa de precisión IPP 500, Memmert Inc) y 30-35 °C (estufa de cultivo IFE 500, Memmert Inc).

La rehidratación de cepas e inoculación de medios se realizó en cabina de seguridad biológica en el Laboratorio de Control de Calidad. La preparación de inóculos se realizó a partir de esferas que contenían, cada una, 550 ufc de cada uno de los microorganismos indicados anteriormente. Como medio de rehidratación para la realización de alícuotas se usó un fluido de rehidratación (14 Days Rehydration Fluid™, BTF, Biomerieux). Cada una se hidrató con 1,1 ml de fluido de rehidratación.

Se inocularon 50 µl con aproximadamente 25 ufc de cada microorganismo en placas de TSA3 por triplicado y se incubaron durante 3 días a 20-25 °C y posteriormente 2 días a 30-35 °C. Como control negativo se utilizó fluido de rehidratación.

Posteriormente, con el fin de comprobar que el crecimiento conjunto de las bacterias y hongos seleccionados no se veía inhibido, se inocularon mezclas de ellos en la misma

Material y Métodos

placa (inóculo de 25 µl con aproximadamente 12 ufc) y se realizaron recuentos tras ambas condiciones de cultivo. El rango de aceptación establecido fue de 12 ± 6 ufc.

4.2.6. *Demostrar la idoneidad de los medios de cultivo microbiológico y métodos de muestreo para la verificación de la esterilidad de los medicamentos fabricados.*

4.2.6.a. *Validación del ensayo de esterilidad según Ph. Eur. 2.6.27 mediante el sistema BACTEC FX40*

La Farmacopea Europea, en su monografía 2.6.27 *Microbiological control of cellular products* [113], establece la posibilidad de utilizar métodos de cultivo alternativos en lugar del ensayo de esterilidad tradicional (2.6.1 *Sterility test*). Este es el caso del ensayo de esterilidad Eur. Ph. 2.6.27 aplicado a productos celulares ya que posee una mayor sensibilidad y un menor tiempo de detección y un menor número de falsos positivos. Estos métodos de cultivo pueden realizarse de forma automatizada y han de ser validados ya que están diseñados para la detección de microorganismos en muestras clínicas (habitualmente de sangre periférica o líquidos biológicos) y no específicamente para la realización de los ensayos de esterilidad en cultivos de células troncales mesenquimales.

4.2.6.a.1. *Medios líquidos de crecimiento microbiológico para la validación del ensayo de esterilidad en sistemas automatizados*

Se utilizaron los siguientes viales de medio de cultivo, compuestos de caldo digerido de caseína de soja, diseñados para la recuperación de microorganismos (bacterias y levaduras) en sangre (de ahí la necesidad de validar su utilización con suspensiones de células troncales mesenquimales).

- Frascos de cultivo aeróbico BACTEC Plus Aerobic/F
- Frascos de cultivo aeróbico BACTEC Peds Plus/F
- Frascos de cultivo BACTEC Lytic Anaerobic/F

Las muestras se sembraron en condiciones de asepsia en la cabina de flujo laminar del laboratorio de control de calidad (volumen óptimo de muestra: 8-10 ml para los frascos Plus Aerobic/F y Lytic Anaerobic/F; 1-3 ml para el Peds Plus/F). Durante la validación realizada se pretendió, además, comparar la efectividad de ambos frascos aerobios (Plus Aerobic/F y Peds Plus/F) con el fin de seleccionar el que mejor se adaptaba a las especiales características de las muestras a analizar. El frasco Peds Plus/F está destinado a su uso con muestras pediátricas y por tanto a volúmenes de muestra más pequeños en comparación al frasco aerobio convencional (Plus Aerobic/F).

4.2.6.a.2. *Sistemas automatizados para la detección de microorganismos*

Existen diferentes equipos automatizados para realizar este ensayo que muestran rendimientos similares [114]. En nuestra unidad se escogió el sistema Bactec FX40 (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) para proceder a la adecuación del ensayo de esterilidad

Material y Métodos

según se describe en el capítulo *Eu Ph 2.6.27 Microbiological control of cellular products*.

El sistema Bactec FX40 está diseñado para la rápida detección de bacterias y hongos en muestras clínicas y permite introducir hasta 40 frascos simultáneamente. Las muestras a analizar se inoculan en los frascos de cultivo y se introducen en el equipo a una temperatura entre 30 y 35°C. Cuando hay microorganismos presentes en los frascos, éstos metabolizan los nutrientes presentes en el medio liberando dióxido de carbono. Un fluorocromo presente en la base de los frascos reacciona con el CO₂ liberado. La base del frasco es iluminada mediante una luz LED (Light Emitting Diodes) y la fluorescencia emitida es captada por los fotodetectores situados en cada una de las estaciones. La cantidad de fluorescencia emitida se relaciona con la cantidad de CO₂ liberado por los microorganismos (figura 17). Los frascos se mantienen en continua agitación para favorecer el desarrollo de los microorganismos y los sensores realizan lecturas cada 10 minutos. Cuando un frasco es detectado como positivo desencadena un sistema de alarma visual y sonora; el frasco entonces es retirado del equipo para extraer muestras que serán analizadas mediante tinción de Gram y sembradas en medios de agar sólido para proceder al aislamiento e identificación de la cepa recuperada. El período de incubación es modificable por el usuario, siendo establecido en este caso en 7 días.

La identificación de los microorganismos aislados en este sistema de detección se realizó en la Unidad de Gestión Clínica de Microbiología del HRU de Málaga mediante el sistema MALDI-TOF.

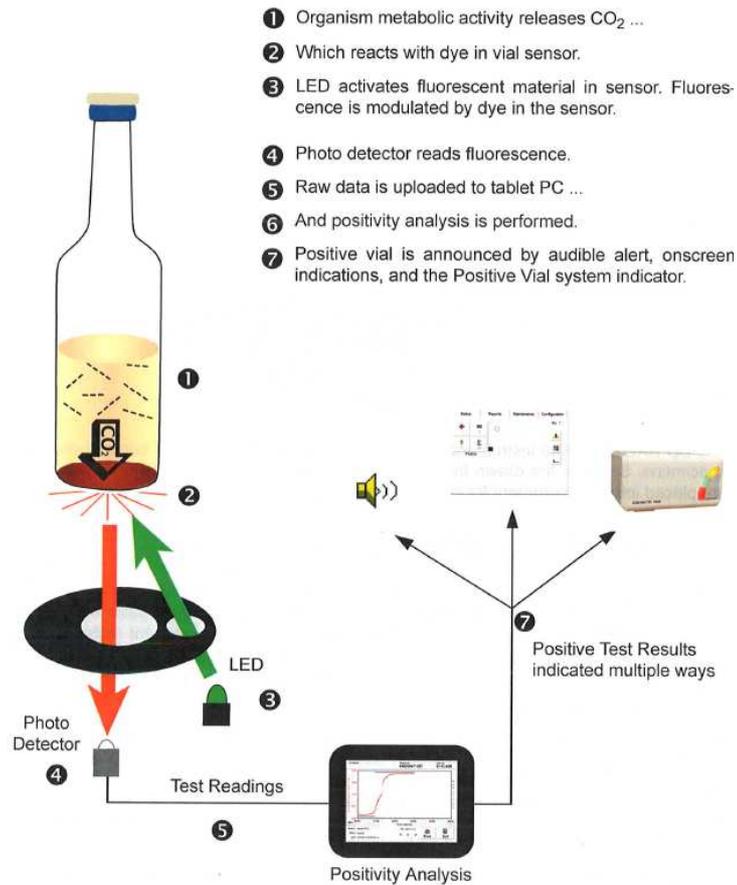


Figura 17. Esquema de funcionamiento Bactec FX40.

4.2.6.a.3. Procedimiento de validación del ensayo de esterilidad

La validación del ensayo se realizó en 2 etapas. Primero se comprobaron las capacidades de promoción de crecimiento de los medios seleccionados y, posteriormente, el método en relación a su especificidad (ausencia de falsos positivos), sensibilidad (límite de detección) y reproducibilidad.

A. Etapa 1. Ensayos de promoción de crecimiento.

Se utilizaron los medios de enriquecimiento Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y Lytic Anaerobic/F con el fin de detectar la presencia de bacterias aeróbicas/anaeróbicas y hongos.

Se seleccionaron los siguientes microorganismos obtenidos comercialmente (Bioball^{TR}) de “The National Collection of Type Cultures (NCTC)” y de “The National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF)” (Collection of Public Health England):

- *Staphylococcus aureus*, NCTC 10788 (ATCC 6538).
- *Bacillus subtilis*, NCTC 10400 (ATCC 6633).
- *Pseudomonas aeruginosa*, NCTC 12924 (ATCC 9027).

Material y Métodos

- *Candida albicans*, NCPF 3179 (ATCC 10231).
- *Aspergillus niger*, NCPF 2275 (ATCC 16404).
- *Clostridium sporogenes*, NCTC 12935 (ATCC 11437).

Preparación de muestras e inoculación de frascos

Se utilizaron Bioball™ MultiShot 550 ufc de los microorganismos mencionados e hidratados con 1,1 ml de solución salina estéril. Mediante jeringa y aguja estéril, se inocularon 0,1 ml (aproximadamente 50 ufc) de la suspensión anterior en cada uno de los frascos Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y Lytic Anaerobic/F. Cada microorganismo se ensayó por duplicado (2 frascos Plus Aerobic/F, 2 frascos Peds Plus/F y 2 frascos Lytic Anaerobic/F). Como control negativo se utilizó 0,1 ml de solución salina estéril utilizada para preparar los inóculos con los microorganismos.

Los frascos inoculados se introdujeron inmediatamente en el equipo Bactec FX40 y se incubaron a 30-35°C durante al menos 7 días antes de informar un resultado como negativo.

Con los frascos en los que se detectó crecimiento se procedió al aislamiento mediante siembra en medios sólidos (agar sangre en atmósfera de aerobiosis, agar chocolate en atmósfera CO₂, agar Brucella en anaerobiosis, agar Sabouraud-Cloranfenicol en aerobiosis y Agar Mc Conkey en aerobiosis), tinción de Gram y posterior identificación mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF FS.

Durante la validación del ensayo, con los frascos negativos tras los 7 días de incubación en el sistema Bactec FX se procedió a realizar un “pase ciego”¹ a los medios nutritivos sólidos anteriores con el fin de detectar falsos negativos.

B. Etapa 2. Validación del método.

En esta etapa se analizó la capacidad del método empleado para poner de manifiesto el crecimiento de microorganismos en presencia de un inóculo real de muestra. Se utilizó una suspensión celular como matriz del inóculo con el fin de determinar si ésta interfería con el ensayo dando lugar a falsos negativos (inhibición del crecimiento de microorganismos por la muestra a ensayar) o falsos positivos (interferencias de la muestra con el método de lectura del equipo Bactec FX40).

Muestra (matriz del inóculo): suspensión celular de 10⁶ CMMTAd/ml en Ringer lactato suplementado con 2,5 % de glucosa y 1 % de albúmina.

¹ Pase ciego también llamado “subcultivo ciego”: es un subcultivo que se realiza con el fin de detectar falsos negativos por errores en el proceso automatizado de lectura. Consiste en obtener muestras del medio de cultivo de los frascos y sembrarlo en diferentes placas de agar sólido incubadas en diferentes condiciones atmosféricas. Este procedimiento es usualmente utilizado en las muestras de hemocultivos [167].

Material y Métodos

En esta etapa se tendrán en cuenta aspectos tales como la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo.

Además de los microorganismos utilizados en la primera etapa, se han introducido 2 cepas diferentes. Una de ellas seleccionadas entre las listadas en la monografía Eu. Ph. 2.6.27 por ser un frecuente colonizador de la piel humana (considerada la principal fuente de contaminación para los productos de terapia celular):

- *Propionibacterium acnes* (DSM¹ 1897), filum *Actinobacteria*, género *Propionibacterium*.

DSM: Leibniz-Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures.

Y la otra, por haber sido aislada en algunas ocasiones en nuestras instalaciones:

- *Kocuria rhizophila* (NCTC 8340), filum *Actinobacteria*, género *Kocuria*.

Análisis de la Sensibilidad y Especificidad del ensayo

Con el fin de estimar la sensibilidad del ensayo, se realizaron inóculos con diferentes concentraciones de microorganismos.

Se utilizaron Bioball™ SingleShot de 30 ufc de los microorganismos mencionados e hidratados con una suspensión de 10⁶ CMMTAd/ml en medio de envasado (solución de Ringer lactato suplementada con 2,5 % de glucosa y 1 % de albúmina), de igual forma que se acondicionan los medicamentos fabricados hasta la fecha.

Cada microorganismo se ensayó, al menos, a dos concentraciones diferentes:

- 10 ufc de cada microorganismo (30 ufc hidratadas con 1,5 ml de suspensión celular en medio de envasado). Mediante jeringa y aguja estéril se inocularon 0,5 ml en el frasco Aerobic/F, 0,5 ml en el frasco Lytic /F y 0,5 ml en el frasco Peds Plus/F.
- 5 ufc de cada microorganismo (30 ufc hidratadas con 3 ml de suspensión celular en medio de envasado). Mediante jeringa y aguja estéril, se inocularon 0,5 ml en el frasco Aerobic/F, 0,5 ml en el frasco Lytic Anaerobic/F y 0,5 ml en el frasco Peds Plus/F. Esta concentración bacteriana fue ensayado por duplicado.

El control negativo se inoculó con 0,5 ml de la misma suspensión celular en medio de envasado sin contaminación previa.

A partir de los frascos en los que se detectó crecimiento se realizaron pases a los medios sólidos descritos con el fin de aislar e identificar los microorganismos. De los frascos negativos al final del período de incubación se realizaron pases “ciegos” a medios sólidos con el fin de descartar falsos negativos en el método de detección (errores de lecturas del equipo).

Material y Métodos

En el caso de *Candida albicans* se realizó una dilución adicional con 15 ufc.

La **sensibilidad (S)** de una prueba diagnóstica es la probabilidad de que una muestra inoculada con algún microorganismo de lugar a un resultado positivo en el ensayo:

$$S = \frac{\text{Verdaderos positivos (Vp)}}{\text{Verdaderos positivos (Vp)} + \text{Falsos negativos (Fn)}} \times 100 \text{ (Fórmula 1)}$$

La **especificidad (E)** de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene una muestra no inoculada con un microorganismo de producir un resultado negativo:

$$E = \frac{\text{Verdaderos negativos (Vn)}}{\text{Verdaderos negativos (Vn)} + \text{Falsos positivos (Fp)}} \times 100 \text{ (Fórmula 2)}$$

El **valor predictivo positivo (VPP)** de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene una muestra positiva de haber sido inoculada con un microorganismo:

$$VPP = \frac{\text{Verdaderos positivos (Vp)}}{\text{Verdaderos positivos (Vp)} + \text{Falsos positivos (Fp)}} \times 100 \text{ (Fórmula 3)}$$

El **valor predictivo negativo (VPN)** de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene una muestra negativa de no haber sido inoculada con un microorganismo:

$$VPN = \frac{\text{Verdaderos negativos (Vn)}}{\text{Verdaderos negativos (Vn)} + \text{Falsos negativos (Fn)}} \times 100 \text{ (Fórmula 4)}$$

C. Análisis de la reproducibilidad del ensayo. Estudio comparativo entre frascos Peds Plus/F y Plus Aerobic/F

Para determinar la reproducibilidad del ensayo y conocer la robustez de la técnica se analizaron 10 réplicas de cada microorganismo por método tradicional y por el sistema Bactec FX:

	Método tradicional	Sistema Bactec FX
Microorganismo aerobio/anaerobio facultativo		
<ul style="list-style-type: none">(<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Aspergillus niger</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Tubos TSB	Frascos Peds Plus/F y Plus Aerobic/F
Microorganismo anaerobio estricto		
<ul style="list-style-type: none">(<i>Clostridium sporogenes</i>)	Tubos THIO	Frascos Lytic Anaerobic/F.

Los microorganismos utilizados fueron los mismos que en los ensayos de promoción de crecimiento (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Clostridium sporogenes*). La

Material y Métodos

concentración escogida para este análisis fue de 5 ufc por ser el límite de detección establecido en esta validación.

Además, en el caso de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos se utilizaron los dos frascos aerobios del sistema Bactec (Peds Plus/F y Plus Aerobic/F) con el fin de analizar cuál de los dos se adapta mejor a las necesidades de los productos de terapia celular.

A partir de Bioball™ 30 ufc SingleShot se realizaron alícuotas de 5 ufc usando como diluyente el producto terminado: ***Suspensión celular de 10⁶ CMMTAd/ml en solución de Ringer lactato suplementado con 2,5 % de glucosa y 1 % de albúmina.***

Las muestras inoculadas en caldo TSB/THIO y frascos del sistema Bactec FX se incubaron a 30-35 °C durante al menos 7 días. En el caso de los tubos inoculados mediante el método tradicional, se realizaron lecturas diarias para comprobar visualmente la turbidez (crecimiento positivo) en comparación con un control negativo inoculado con la suspensión celular anterior.

En esta fase de la validación del ensayo la identificación final de los microorganismos aislados se realizó directamente de los frascos y medios líquidos utilizados mediante tinción de Gram.

4.3. OBJETIVO 2. DISEÑAR E IMPLANTAR LOS PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA NECESARIOS PARA PRESERVAR LAS CONDICIONES AMBIENTALES EXIGIDAS PARA LA FABRICACIÓN ASÉPTICA DE MEDICAMENTOS EN LA UPC.

4.3.1. Validación de la capacidad germicida de los agentes desinfectantes utilizados

Con el fin de verificar la efectividad de los desinfectantes utilizados y su capacidad para ejercer el efecto esperado en los diferentes tipos de superficies a desinfectar, se procedió a validar la eficacia de los 3 biocidas con actividad esporicida: Biocida PH, Biocida AQ y Biocida AH, y los dos biocidas no esporicidas (Etanol 70% e Isopropanol 70%) ya que son los desinfectantes habituales utilizados para la asepsia de manos y materiales durante las actividades de producción. Los tiempos de contacto óptimo según las especificaciones de los fabricantes se describen en la tabla 13.

Biocida	Bactericida	Fungicida	Esporicida
Biocida PH	5 min	15 min	15 min
Biocida AH	5 min	15 min	> 20 min
Biocida AQ	5 min	15 min	60 min
Alcohol etílico o isopropílico al 70%	5 min	15 min	Sin actividad

Tabla 13. Tiempo de contacto establecidos por los fabricantes de los biocidas para ejercer actividad bactericida/fungicida/esporicida.

La validación de la efectividad de los desinfectantes se realizó en 2 etapas. En la primera, se realizaron ensayos *in vitro* para comprobar la actividad biocida de cada uno de ellos mediante diluciones crecientes. En la segunda etapa se verificó su actividad biocida al aplicarse en las diferentes superficies a desinfectar con el fin de comprobar la no interacción de estas y el biocida.

4.3.1.a. Etapa 1: Ensayo de la capacidad desinfectante en tubo

La finalidad de este ensayo fue conocer la mínima concentración biocida del producto. Se enfrentaron diluciones crecientes de los biocidas con suspensiones de microorganismos obtenidas a partir de cepas comerciales BioBall™ MultiShot 550 mixed kit de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* y la cepa propia de *Micrococcus luteus*. La suspensión de *Bacillus subtilis* se preparó a partir de una cepa comercial con $1,1 \times 10^8$ esporas (BioBall™ *Bacillus subtilis* 10^8 Spores, BTF. BioMérieux) y la de *Aspergillus brasiliensis/niger* a partir de un preparado con 10.000 esporas (BioBall™ HighDose-10K *Aspergillus brasiliensis* Spores, BTF. BioMérieux).

- *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 6538
- *Escherichia coli*, cepa NCTC 12923
- *Bacillus subtilis*, cepa ATCC 19659
- *Candida albicans*, cepa ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis/niger*, cepa ATCC 16404

Material y Métodos

Con el fin de conseguir un inóculo inicial lo suficientemente grande como para medir adecuadamente la actividad desinfectante, se transfirieron 550 ufc (1 vial) de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* a botellas de Caldo Tripticasa Soja TSB de 100 ml y se incubaron durante 18–24 horas a 30–35 °C. Transcurrido ese tiempo y, según una primera valoración visual de la densidad bacteriana, se sembraron 10 µl de diluciones 1/1000 de cada uno de los microorganismos seleccionados en placas TSA3 con el fin de favorecer la dispersión de los microorganismos en toda la superficie del agar y realizar un recuento en placa para determinar la concentración bacteriana obtenida que será utilizada posteriormente para los cálculos (tabla 14).

Microorganismo	Ufc en placa de TSA (dilución 1/1000) 10µl	Concentración en la solución de partida (ufc/µl)	Ufc Inóculo N ₀ (500 µl solución de partida)
<i>Staphylococcus aureus</i>	280	28000	14 x 10 ⁶
<i>Micrococcus luteus</i>	300	30000	15 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	185	18500	9,25 x 10 ⁶
<i>Candida albicans</i>	68	6800	3,4 x 10 ⁶

Tabla 14. Unidades formadoras de colonias de cada microorganismo presentes en el inóculo inicial N₀

Para la preparación del inóculo de *Bacillus subtilis*, se disolvió una Bioball (10⁸ esporas) en 20 ml de agua destilada estéril (N₀=2,5 x 10⁶ esporas). No se utilizó caldo TSB para realizar la suspensión para evitar, en lo posible, la germinación de las esporas.

Las Bioball de *Aspergillus brasiliensis/niger* (N₀=10000 esporas) se disolvieron directamente en las diluciones testadas (1/1, 1/2 y 1/4).

Se sembraron inóculos de 500 µl de la solución anterior de *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli*, *C. albicans* y *B. subtilis* (N₀) en tubos con 10 ml de diluciones crecientes del biocida (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256) en suero fisiológico estéril. Las Bioball de *A. brasiliensis/niger* (N₀=10000 esporas) se disolvieron directamente en las diluciones ensayadas (1/1, 1/2 y 1/4), tomando las siguientes muestras a los 5, 10 y 15 minutos:

- 100 µl que se sembraron en medio TSA3 con el fin de realizar un recuento en caso de positividad. Incubación a 30–35 °C ≤ 72 horas
- 50 µl que se inocularon en tubos de caldo Tripticasa Soja TSB de 9 ml con el fin de realizar una inactivación por dilución de la actividad residual del biocida y permitir el desarrollo de turbidez en su caso. Incubación a 30–35 °C ≤ 7 días.

El procedimiento se describe en el siguiente esquema (figura 18).

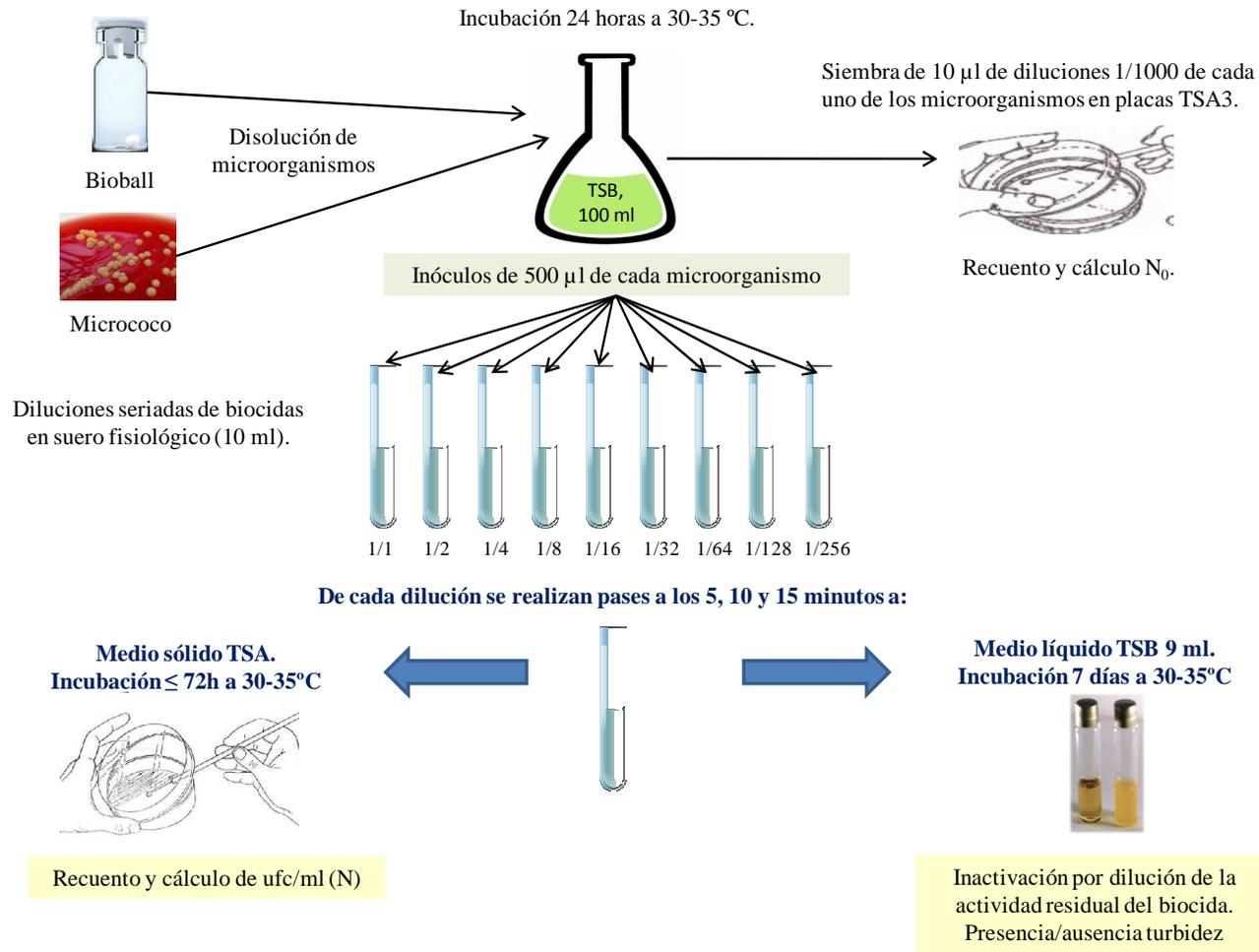


Figura 18. Esquema del proceso de cálculo del inóculo inicial y de la efectividad de los desinfectantes a diferentes diluciones.

Material y Métodos

En los ensayos cuantitativos en suspensión (en medio líquido), el criterio de aceptación para considerar una adecuada capacidad bactericida es la reducción de al menos 5 logaritmos [115] y de 4 para demostrar capacidad fungicida y esporicida [116] [117] según la fórmula:

$$\text{Número de Reducciones Logarítmicas} = \text{Log} (N_0/N)$$

Donde:

N_0 : número de ufc antes de la exposición al desinfectante

N: número de ufc recuperadas tras la exposición.

4.3.1.b. Etapa 2: Prueba de desinfección en superficies

Se realizó sobre materiales que habitualmente son aseptizados en nuestras instalaciones: plástico y acero inoxidable. Como superficie de plástico se escogió una botella de medio de cultivo de 500 ml y como superficie de acero inoxidable, la bandeja de agua de un incubador de CO₂.

Con el fin de obtener suficiente volumen para repartir los inóculos sobre una superficie de 25 cm² de plástico y de acero inoxidable, se prepararon:

- 5 µl de la suspensión inicial anterior (N_0) de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Bacillus subtilis* y se diluyeron cada una en 15 µl de agua destilada estéril.
- una Bioball (10000 esporas) de *Aspergillus brasiliensis/niger*, que se disolvió en 100 µl de agua destilada estéril.

Los inóculos de 20 µl de *Staphylococcus aureus* ($N_0=140000$ ufc), *Micrococcus luteus* ($N_0=150000$ ufc), *Escherichia coli* ($N_0=92500$ ufc), *Candida albicans* ($N_0=34000$ ufc) y *Bacillus subtilis* ($N_0=25000$ ufc) y 40 µl *Aspergillus brasiliensis/niger* ($N_0 = 4000$ ufc) se dejaron secar al aire durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo se realizó un muestreo de superficie con placas de contacto CT3P de 55 mm de diámetro (25 cm² de superficie de contacto) que contienen medio Agar Tripticasa de Soja y agentes neutralizantes. Estas placas se utilizaron como control positivo.

En otra zona del mismo material y superficie (25 cm²), se repartió la misma cantidad de las cepas anteriores y se dejó secar durante 30 minutos. A continuación se aplicó el biocida sin diluir y se dejó actuar durante 5 minutos para comprobar la actividad bactericida y 15 minutos para la actividad fungicida y esporicida, antes de tomar una muestra con placas CT3P.

El ensayo se realizó a una temperatura ambiente entre 18 y 25 °C (23,5 °C). Las placas se incubaron a 30-35 °C ≤ 72 horas.

En los ensayos cuantitativos en superficies no porosas, para considerar al producto como bactericida, se ha de demostrar una reducción logarítmica de 4 en el número de bacterias viables y para considerar al producto como fungicida o esporicida debe demostrarse una reducción logarítmica de 3 en el número de células o conidias fúngicas/esporas viables [114] [135], según la fórmula descrita en la etapa 1.

4.3.1.c. Verificación de la esterilidad de los desinfectantes con el transcurso del tiempo

Los desinfectantes utilizados para la aseptización de materiales e instalaciones han de mantenerse estériles durante el período efectivo de su utilización y cada Unidad ha de establecer los tiempos máximos en los que dichos desinfectantes se mantienen estériles (en parte debido a la conservación de sus propiedades desinfectantes) y no son, en sí mismos una fuente de contaminación.

Se estableció un periodo de rotación de los biocidas de 1 mes, de esta forma, todas las limpiezas realizadas durante este periodo se realizaron utilizando el mismo tipo de biocida. Con el fin de que los biocidas abiertos, pero no consumidos durante un mes, pudieran utilizarse de nuevo tras la rotación, se estableció un periodo de uso de los mismos de 3 meses. Para verificar que estos desinfectantes se mantenían estériles durante el tiempo indicado, se tomaron 1,8 ml de desinfectante cada semana durante 12 semanas consecutivas. Cada muestra se sembró en 2 tubos de TSB de 9 ml (0,9 ml en cada tubo) y se incubaron simultáneamente durante 7 días a 20-25°C y 30-35°C. Se consideró que los biocidas permanecían estériles si el TSB no presentaba turbidez al final del periodo de incubación.

Tras la toma de cada muestra, los desinfectantes se introdujeron de nuevo en los ciclos de limpieza correspondientes para continuar su utilización y verificar de esta forma el mantenimiento de la esterilidad en condiciones reales de uso.

4.3.2. Diseño, validación e implantación de un procedimiento de limpieza adaptado a las necesidades de la instalación.

Los procedimientos de limpieza implantados en las instalaciones dedicadas a la fabricación de medicamentos han de ser validados con el fin de verificar su eficacia [120].

4.3.2.a. Limpieza de instalaciones

En el área clasificada de la Unidad de Producción Celular se realizan 3 tipos de limpieza: mensual, semanal y ocasional. La limpieza semanal se realiza sobre superficies de trabajo, superficies exteriores de equipos (cabines de flujo laminar, incubadores, centrifugas, etc.) y suelos. La limpieza mensual incluye, además, techos y paredes. La limpieza ocasional se reserva para aquellas zonas específicas en las que se ha detectado una elevación puntual de la biocontaminación o realizado alguna labor de

Material y Métodos

mantenimiento de la instalación (cambio de filtros HEPA terminales, introducción de nuevo equipamiento, tras realización de actividades de cualificación, etc.) e incluyen las mismas zonas que la limpieza mensual.

La limpieza de la instalación se realiza por una empresa subcontratada por el Hospital Regional de Málaga. Se programaron ciclos de formación teórica y práctica inicial y continuada (periodicidad anual) sobre los procedimientos de entrada y comportamiento en áreas clasificadas, métodos de limpieza específicos para este tipo de instalaciones, manejo de biocidas y conceptos básicos de microbiología con el fin de evitar que los procedimientos de limpieza y su aplicación supusieran una fuente adicional de biocontaminación. En total se realizó la capacitación de 16 operarios de limpieza. Posteriormente se decidió que estas tareas deberían ser realizadas por un reducido número de personas con alta cualificación por lo que la validación y posteriores limpiezas se han realizado por 8 operarios diferentes. Las limpiezas semanales se realizaron por 2 personas, mientras que las mensuales fueron realizadas por 4 de ellas (ya que incluyeron paredes y techos).

Semestralmente se toman muestras del personal mediante placas de contacto CT3P en manos, antebrazos y hombros, una vez que han completado el procedimiento de entrada y vestimenta (zona limpia del Vestuario B), con el fin de comprobar el grado de eficacia de los procedimientos establecidos y el nivel de seguimiento de los protocolos de entrada.

La limpieza de las áreas de grado B, C y D se realiza siempre empezando por las zonas de grado B y finalizando por las de grado D. Dentro de cada área, la limpieza se realiza comenzando por las zonas más limpias; primero se limpian los techos, posteriormente las paredes, a continuación las superficies de trabajo y exteriores de equipos y, finalmente, los suelos.

La presente validación se realizó utilizando los biocidas que habían proporcionado eficacias bactericidas, fungicidas y esporicidas más altas, en rotación mensual:

- Biocida PH (6% de peróxido de hidrógeno en agua desionizada) y
- Biocida AQ (dióxido de cloro estabilizado y un compuesto de amonio cuaternario).

La limpieza de techos, paredes y lugares de difícil acceso se realizó usando:

- Mopas equipadas con mango telescópico, de acero inoxidable electropulido y autoclavables (SlimLine™ Mop, Micronova Manufacturing Inc. California, US),
- Cubremopas acolchados esterilizables (SlimLine™ NovaPoly Mop Head Slip Cover, Micronova Manufacturing Inc. California, US),
- Toallitas de baja liberación de partículas, estériles (Bioclean Oryx™. Nitritex Ltd., UK).

Material y Métodos

El cabezal de mopa de acero inoxidable se cubre con el cubremopas esterilizado, que proporciona una superficie más blanda y de mejor contacto que la mopa de acero. A continuación, se colocan sobre los cubremopas las toallitas impregnadas con el biocida en rotación que corresponda al mes en curso.

En los lugares accesibles como mesas, estanterías, sillas, etc. se utilizaron sólo las toallitas impregnadas.

4.3.2.b. Limpieza de equipos

Debido a la criticidad de los procedimientos realizados en el interior de las CFL (grado A) y de otros equipos como incubadores y centrífugas, la limpieza de estas zonas se realiza exclusivamente por el personal del Departamento de Producción.

Debido al poder corrosivo de los esporicidas, la limpieza interior de los equipos se realiza con toallitas estériles impregnadas en alcohol 70%. La acción biocida en el interior de las CFL queda garantizada por la aplicación de ciclos de desinfección UV de 30 minutos, tras cada uso.

Se realizan, 3 tipos de limpiezas: rutinaria, mensual y “entre lotes”.

La limpieza rutinaria se realiza a los equipos utilizados tras cada sesión de trabajo: CFL, centrífugas, microscopio y mesa de apoyo. La limpieza de las CFL consiste en la limpieza de las superficies (techo, paredes laterales y frontal y bandeja de trabajo), la de las centrífugas en la limpieza de los cestillos y superficie interna; en cuanto a los microscopios, se limpian las superficies y especialmente los oculares (que han estado en contacto con la piel que rodea los ojos).

La limpieza mensual de las CFL consiste (además de la limpieza rutinaria) en desmontar y limpiar la bandeja de trabajo por las dos caras, limpieza de la zona bajo la bandeja, y de la superficie interna del cristal protector frontal.

La limpieza mensual de los incubadores conlleva la extracción de las bandejas y rieles interiores para limpiar techo, fondo, paredes, suelo y parte interior de puertas. Posteriormente se limpian rieles y bandejas justo antes de su colocación. Semanalmente se procede al cambio de agua de las bandejas de los incubadores que proporcionan la humedad adecuada para el mantenimiento de los cultivos celulares; se utiliza agua estéril y apirógena de calidad inyectable (Laboratorios Grifols Movaco S.A).

Adicionalmente, se realiza una limpieza “entre lotes” cada vez que finaliza el procesamiento de un lote a fin de evitar la contaminación cruzada con el siguiente lote que se vaya a procesar en ellos. Se circunscribe a la limpieza exhaustiva de la cabina de flujo laminar y los utensilios ubicados en su interior (micropipetas y gradillas) e incubadores de CO₂, de igual forma que la limpieza mensual.

4.3.2.c. Validación del Procedimiento de limpieza

La validación del procedimiento de limpieza consistió en la ejecución de 3 limpiezas semanales y 3 mensuales que mostraran consecutivamente resultados satisfactorios en los controles microbiológicos: muestreo y lectura de las placas de contacto CT3P y SC3P tomadas en cada uno de los puntos de control seleccionados al día siguiente de la limpieza (37 superficies tras la realización de las limpiezas semanales y 71 tras las correspondientes limpiezas mensuales).

Orden de validación/tipo de limpieza	Esporicida utilizado
– 1ª Validación limpieza mensual	Biocida PH
– 2ª Validación limpieza mensual	Biocida AQ
– 3ª Validación limpieza mensual	Biocida PH
– 1ª Validación limpieza semanal	Biocida PH
– 2ª Validación limpieza semanal	Biocida AQ
– 3ª Validación limpieza semanal	Biocida AQ

Las placas de CT3P utilizadas se incubaron a 30-35 °C durante 3 días y las de SC3P a 20-25 °C durante 5 días. Como criterios de aceptación se establecieron los límites de contaminación microbiana recomendados en el Anexo 1 de las NCF para cada una de las placas utilizadas.

Se eligieron los siguientes puntos de muestreo (tabla 15):

- 37 superficies de control tras la realización de las limpiezas semanales y
- 71 tras las correspondientes limpiezas mensuales.

Sala	Referencia	Descripción del punto de muestreo	Periodicidad		Clasificación	Criterio de aceptación
			M	S		
SP1	CFL-01i	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-01	X	X	A	< 1 ufc
	CFL-01c	Superficie central bandeja trabajo CFL-01	X	X		
	CFL-01b	Sup. interior bajo bandeja UPC-CFL-01	X			
	CFL-02i	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-02	X	X		
	CFL-02c	Superficie central bandeja trabajo CFL-02	X	X		
	CFL-02b	Sup. interior bajo bandeja UPC-CFL-02	X			
	SAS-01e	Sup. basal interior SAS-01 entrada	X	X	B	≤ 5 ufc
	SAS-01s	Sup. basal interior SAS-01 salida de material	X	X		
	SP1-INC	Superficie exterior (techo) incubador INC-04	X	X		
	SP1-ME	Superficie mesa microscopio	X	X		
	SP1-CFG	Superficie superior centrifugadora CFG-01	X	X		
	SP1-CAR	Superficie bandeja superior carrito	X	X		
	SP1-E	Suelo, zona de entrada a sala	X	X		
	SP1-MC	Suelo, punto de máxima circulación de sala	X	X		
	SP1-RE	Rejilla retorno de aire en pared tras CFG-01	X			
	SP1-PP	Pomo de puerta entrada a sala (desde SP1)	X			
	SP1-P1	Pared tras CFL-01	X			
	SP1-P2	Pared tras incubadores	X			

Material y Métodos

	SP1-T	Techo zona central	X			
SP2	CFL-03i	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-03	X	X	A	< 1 ufc
	CFL-03c	Superficie central bandeja trabajo CFL-03	X	X		
	CFL-03b	Sup. interior bajo bandeja UPC-CFL-03	X			
	CFL-04i	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-04	X	X		
	CFL-04c	Superficie central bandeja trabajo CFL-04	X	X		
	CFL-04b	Sup. interior bajo bandeja UPC-CFL-04	X			
	SAS-02e	Sup. basal interior SAS-02 entrada material	X	X	B	≤ 5 ufc
	SAS-02s	Sup. basal interior SAS-02 salida material	X	X		
	SP2-INC	Superficie exterior (techo) incubador INC-04	X	X		
	SP2-ME	Superficie mesa microscopio	X	X		
	SP2-CFG	Superficie superior centrifugadora CFG-02	X	X		
	SP2-CAR	Superficie bandeja superior carrito	X	X		
	SP1-E	Suelo, zona de entrada a sala	X	X		
	SP2-MC	Suelo, punto de máxima circulación de sala	X	X		
	SP2-RE	Rejilla retorno de aire en pared junto incubadores	X			
	SP2-PP	Pomo de puerta entrada a sala (desde SP2)	X			
	SP2-P1	Pared, zona acristalada con SP3	X			
	SP2-P2	Pared tras CFL-03	X			
SP2-T	Techo zona central	X				
SP3	CFL-05i	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-05	X	X	A	< 1 ufc
	CFL-05c	Superficie central bandeja trabajo CFL-05	X	X		
	CFL-05b	Sup. interior bajo bandeja CFL-05	X			
	SAS-03	Sup. basal interior de comunicación SP3-SP1	X	X	B	≤ 5 ufc
	SAS-04	Sup. basal interior de comunicación SP3-SP2	X	X		
	SAS-05	SAS salida de producto terminado	X	X		
	SP3-MC	Suelo, punto de máxima circulación de sala	X	X		
	SP3-E	Suelo, zona de entrada a sala	X	X		
	SP3-RE	Rejilla retorno de aire bajo intercomunicador	X			
	SP3-P1	Pared tras CFL-05	X			
	SP3-PP	Pomo puerta entrada a sala (desde SP3)	X			
	SP3-T	Techo zona central	X			
Vestuario B	VB-B	Sup. superior banco separación “zona limpia/sucia”	X	X	B	≤ 5 ufc
	VB-PP1	Pomo de puerta entrada a SP1 (desde VB)	X			
	VB-PP2	Pomo de puerta entrada a SP2 (desde VB)	X			
	VB-PP3	Pomo de puerta entrada a SP3 (desde VB)	X			
	VB-T	Techo zona central	X			
	VB-RE	Rejilla retorno aire en pared de “zona sucia”	X		B-C*	≤ 15 ufc*
VB-S	Suelo de entrada antes del banco	X	X			
Vestuario C	VC-S	Suelo, zona central	X	X	C	≤ 25 ufc
	VC-PP	Pomo puerta acceso a vestuario B (desde VC)	X			
	VC-RE	Rejilla retorno de aire situada en pared	X			
	VC-T	Techo zona central	X			
Almacén D	AL-S	Suelo, zona central	X	X	D	≤ 50 ufc
	AL-PP	Pomo de puerta acceso a Distribuidor	X			
	AL-P1	Pared tras cámara refrigeradora	X			

Material y Métodos

	AL-T	Techo zona central	X			
Distribuidor	D-S	Suelo, zona central	X	X		
	D-PP	Pomo de puerta acceso a Vestuario C	X			
	D-T	Techo zona central	X			
Vestuario D	VD-S	Suelo, zona central	X	X		
	VD-PP	Pomo de puerta acceso a Distribuidor	X			
	VD-T	Techo zona central	X			

*Tabla 15. Puntos de muestreo para la validación del proceso de limpieza mensual (M) y semanal (S). *La zona sucia del Vestuario B se consideró en un primer momento como una zona intermedia entre los grados B y C debido a que es el lugar de colocación del mono estéril.*

4.4. OBJETIVO 3. IDENTIFICAR LOS PUNTOS CRÍTICOS DE RIESGO DE BIOCONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN EL PROCESO DE FABRICACIÓN ASÉPTICA IMPLANTADO.

Para realizar un adecuado estudio basado en Análisis de Riesgos es necesario conocer adecuadamente los procedimientos de fabricación implantados, la instalación donde se van a realizar, los puntos críticos del proceso y el riesgo para la biocontaminación de cada uno de ellos.

El estudio se realizó en base al conocimiento adquirido durante la puesta a punto de la instalación e implantación de los procedimientos de fabricación y limpieza y con los datos de biocontaminación obtenidos desde noviembre de 2011 a septiembre de 2012.

4.4.1. ETAPA 1: Recogida de datos previos y realización de análisis de riesgos.

4.4.1.a. Recogida de datos previos (noviembre de 2011 a septiembre de 2012)

Una vez finalizadas las obras de adecuación de la instalación e introducción del equipamiento inicial necesario, se procedió a la limpieza y desinfección de la instalación. Durante esta etapa de preparación del área clasificada, considerada como condición “as built” [2], se realizaron repetidas limpiezas y controles ambientales hasta conseguir disminuir la contaminación hasta unos niveles acordes a lo establecido en las NCF para cada grado de clasificación.

La instalación fue entonces utilizada para implantar los procedimientos de producción y realizar la validación inicial de los procesos de aislamiento, expansión y envasado de medicamentos. Se procedió igualmente a la validación de los procedimientos de limpieza y desinfección de las instalaciones tal y como se ha descrito previamente.

Este período sirvió para conocer en profundidad los procesos implantados, y el nivel de biocontaminación de la instalación “en funcionamiento”, permitiendo la detección e identificación de puntos críticos. Los puntos seleccionados para el control de la biocontaminación ambiental se establecieron con la premisa de controlar todos los grados de clasificación ambiental mediante el uso, en cada uno de ellos, de las tres técnicas de muestreo disponibles (volumétrico de aire, sedimentación de partículas y superficies de contacto) y se realizaron al día siguiente de la correspondiente limpieza rutinaria semanal o mensual con el fin de verificar los procedimientos de limpieza y desinfección establecidos.

Los controles de la biocontaminación se diseñaron para:

- monitorizar todos los procesos de fabricación realizados en grado A, incluyendo las operaciones de alicuotado de medios de cultivo, procesamiento de materiales de partida, operaciones de subcultivo, cambios de medio y envasado de productos terminados:

Material y Métodos

- Recuento de partículas totales: en la zona central interior de cada cabina de flujo laminar mediante contador óptico de partículas, durante la duración total del correspondiente proceso de fabricación aséptica. *Criterios de aceptación establecidos en las NCF: (3520 partículas/m³ de diámetro $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y 20 partículas/m³ de diámetro $\geq 5 \mu\text{m}$)*
- Recuento de partículas viables mediante:
 - placas de sedimentación situadas en el interior de la CFL y abiertas durante todo el proceso de fabricación aséptica [TSA3 y SN3P hasta Feb 2012 (los resultados se expresan como media de las ufc de las dos placas) y a partir de esta fecha, sólo TSA3].
 - placas de impronta de guantes, en el interior de la CFL al finalizar cada etapa del proceso de fabricación [TSA3 y SN3P hasta Feb 2012 (los resultados se expresan como media de las ufc de las dos placas) y a partir de esta fecha, sólo TSA3].
 - placas de contacto en la zona central de la bandeja de la CFL al finalizar cada etapa del proceso de fabricación [CT3P y SC3P hasta Feb 2012 (los resultados se expresan como media de las ufc de las dos placas) y a partir de esta fecha, sólo CT3P]. En los tres casos, los *criterios de aceptación establecidos en las NCF son el crecimiento inferior a 1 ufc*.
- evaluar el nivel de biocontaminación del área clasificada realizando controles semanales y mensuales de todas las zonas de la instalación al día siguiente de la correspondiente limpieza. Se utilizaron placas de TSA y Sabouraud por cada punto de muestreo hasta febrero de 2012 (los resultados en este periodo se expresan como la media de las ufc de ambas placas).

Los niveles de alerta y acción inicialmente establecidos fueron (tabla 16):

- Nivel de acción: el límite máximo permitido para cada grado según el tipo de muestreo establecido en el Anexo 1 de las NCF.
- Nivel de alerta: establecidos por nosotros en el 60 % del valor del nivel de acción correspondiente.

Tipo de muestreo	Grado A		Grado B		Grado C		Grado D	
	Nivel Acción	Nivel Alerta						
Volumétrico (ufc/m ³)	≥ 1	N.A.	≥ 10	≥ 6	≥ 100	≥ 60	≥ 200	≥ 120
Sedimentación	≥ 1	N.A.	≥ 5	≥ 3	≥ 50	≥ 30	≥ 100	≥ 60
Contacto	≥ 1	N.A.	≥ 5	≥ 3	≥ 25	≥ 15	≥ 50	≥ 30

Tabla 16. Niveles de alerta y acción (en ufc) inicialmente establecidos según el grado de clasificación ambiental y tipo de muestreo utilizado.

En cuanto a los puntos de muestreo, se establecieron con la premisa de controlar todas las zonas mediante la utilización de los tres métodos de muestreo.

Material y Métodos

A. Puntos de muestreo volumétrico de aire:

Semanalmente, se tomaron muestras de 1 m³ de aire en cada uno de los puntos indicados en la tabla 17 (un plano detallado con los puntos de muestreo se detalla en el anexo II).

Sala	Referencia	Grado	Descripción del punto de muestreo
SP1	A-CFL-01	A	Zona central interior CFL-01
	A-CFL-02	A	Zona central interior CFL-02
	A-SP1	B	Punto central de sala. Altura de trabajo
SP2	A-CFL-03	A	Zona central interior CFL-03
	A-CFL-04	A	Zona central interior CFL-04
	A-SP2	B	Punto central de sala. Altura de trabajo
SP3	A-CFL-05	A	Zona central interior CFL-05
	A-SP3	B	Punto central de sala. Altura de trabajo
Vestuario B	A-VB	B	Punto central de sala. Sobre el banco.
Vestuario C	A-VC	C	Punto central de sala. Suelo.
Distribuidor	A-DI	D	Punto central de sala. Suelo.
Almacén D	A-AL	D	Punto central de sala. Suelo.
Vestuario D	A-VD	D	Punto central de sala. Suelo.

Tabla 17. Puntos de control semanal mediante muestreo volumétrico de aire.

B. Puntos de muestreo por sedimentación de partículas viables (periodicidad semanal):

La exposición del medio de agar fue de aproximadamente 4 horas. Los puntos establecidos se detallan en la tabla 18 y un plano con el detalle de la localización de los puntos de muestreo se presenta en el anexo III.

Sala	Referencia	Grado	Descripción del punto de muestreo
SP1	S-CFL-01	A	Zona central interior CFL-01
	S-CFL-02	A	Zona central interior CFL-02
	S-CFL-02E	B	Sobre techo exterior de CFL-02
	S-INC-02	B	Sobre techo exterior del incubador INC-02
	S-CFG-01	B	Sobre centrífuga CFG-01
SP2	S-CFL-03	A	Zona central interior CFL-03
	S-CFL-04	A	Zona central interior CFL-04
	S-CFL-03E	B	Sobre techo exterior de CFL-03
	S-INC-04	B	Sobre techo exterior del incubador INC-04
	S-CFG-02	B	Sobre centrífuga UPC-CFG-02
SP3	S-CFL-05	A	Zona central interior CFL-05
	S-SP3	B	Sobre mesa de trabajo
Vestuario B	S-VB	B	Sobre el banco del Vestuario B
Vestuario C	S-VC	C	Altura del suelo, zona central Vestuario C
Distribuidor	S-DI	D	Altura del suelo, zona central Distribuidor
Almacén D	S-AL	D	Altura del suelo, zona central Almacén GMP
Vestuario D	S-VD	D	Altura del suelo, zona central Vestuario D

Tabla 18. Puntos de muestreo por sedimentación de partículas viables.

Material y Métodos

Los puntos de muestreo situados encima del techo de las cabinas de flujo laminar en las Salas de Producción (S-CFL-02E, S-CFL-03E y S-CFL-05E) se seleccionaron por estar próximas a los filtros HEPA terminales (aproximadamente a una distancia de 50 cm del techo) con el fin de comprobar la adecuada eficacia de filtración de los mismos.

Los puntos situados encima de los incubadores de las Salas de Producción 1 y 2 (S-INC-02, S-INC-04) se seleccionaron por estar en zonas de flujo de aire turbulento y alejado de los retornos, en zonas donde el flujo de aire podría no barrer adecuadamente la zona y por ello acumular mayor número de partículas.

C. Muestreo de superficies mediante placas de contacto:

En este control se diferenciaron dos tipos de muestreos: *muestreo semanal*, que incluye suelos, equipos y superficies de trabajo; y *muestreo mensual* que incluye, además, paredes y techos (tabla 19).

El plano detallado con los puntos de muestreo semanales y mensuales se presenta en los anexos IV y V respectivamente.

Sala	Referencia	Grado	Descripción del punto de muestreo
SP1	CFL-01i	A	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-01
	CFL-01c	A	Superficie central bandeja trabajo CFL-01
	CFL-01L*	A	Superficie pared lateral izquierda CFL-01
	CFL-02i	A	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-02
	CFL-02c	A	Superficie central bandeja trabajo CFL-02
	CFL-02L*	A	Superficie pared lateral izquierda CFL-02
	SAS-01e	B	Superficie basal interior SAS-01 entrada de material
	SAS-01s	B	Superficie basal interior SAS-01 salida de material
	SP1-INC	B	Superficie exterior (techo) incubador INC-02
	SP1-ME	B	Superficie mesa microscopio
	SP1-CFG	B	Superficie superior centrifugadora CFG-01
	SP1-CAR	B	Superficie bandeja superior carrito
	SP1-E	B	Suelo, zona de entrada a sala
	SP1-MC	B	Suelo, punto de máxima circulación de sala
	SP1-RE*	B	Rejilla retorno de aire situada en pared tras CFG-01
	SP1-PP*	B	Pomo de puerta entrada a sala (desde la cara SP1)
	SP1-P1*	B	Pared tras CFL-01
SP1-P2*	B	Pared tras incubadores	
SP1-T*	B	Techo zona central	
SP2	CFL-03i	A	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-03
	CFL-03c	A	Superficie central bandeja trabajo CFL-03
	CFL-03L*	A	Superficie pared lateral izquierda CFL-03
	CFL-04i	A	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-04
	CFL-04c	A	Superficie central bandeja trabajo CFL-04
	CFL-04L*	A	Superficie pared lateral izquierda CFL-04
	SAS-02e	B	Superficie basal interior SAS-02 entrada de material
	SAS-02s	B	Superficie basal interior SAS-02 salida de material

Material y Métodos

	SP2-INC	B	Superficie exterior (techo) incubador INC-04
	SP2-ME	B	Superficie mesa microscopio
	SP2-CFG	B	Superficie superior centrifugadora CFG-02
	SP2-CAR	B	Superficie bandeja superior carrito
	SP2-E	B	Suelo, zona de entrada a sala
	SP2-MC	B	Suelo, punto de máxima circulación de sala
	SP2-RE*	B	Rejilla retorno de aire situada pared zona al lado de incubadores
	SP2-PP*	B	Pomo de puerta entrada a sala (desde la cara SP2)
	SP2-P1*	B	Pared, zona acristalada con SP3
	SP2-P2*	B	Pared tras CFL-03
SP2-T*	B	Techo zona central	
SP3	CFL-05i	A	Superficie izquierda bandeja trabajo CFL-05
	CFL-05c	A	Superficie central bandeja trabajo CFL-05
	CFL-05L*	A	Superficie pared lateral izquierda CFL-05
	SAS-03	B	Superficie basal interior de comunicación SP3-SP1
	SAS-04	B	Superficie basal interior de comunicación SP3-SP2
	SAS-05	B	SAS de salida a producto terminado
	SP3-ME	B	Superficie mesa de trabajo
	SP3-E	B	Suelo, zona de entrada a sala
	SP3-MC	B	Suelo, punto de máxima circulación de sala
	SP3-RE*	B	Rejilla retorno de aire situada pared bajo intercomunicador sala
	SP3-PP*	B	Pomo de puerta entrada a sala (desde la cara SP3)
	SP3-P1*	B	Pared tras CFL-05
SP3-T*	B	Techo zona central	
Vestuario B	VB-B	B	Superficie superior banco separación “zona limpia/zona sucia”
	VB-S	B	Suelo, “zona sucia”
	VB-PP1*	B	Pomo de puerta entrada a SP1 (desde la cara Vestuario B)
	VB-PP2*	B	Pomo de puerta entrada a SP2 (desde la cara Vestuario B)
	VB-PP3*	B	Pomo de puerta entrada a SP3 (desde la cara Vestuario B)
	VB-RE*	B	Rejilla retorno de aire situada en pared de “zona sucia”
	VB-T*	B	Techo zona central
Vestuario C	VC-S	C	Suelo, zona central
	VC-PP*	C	Pomo de puerta acceso a estuario B (desde vestuario C)
	VC-RE*	C	Rejilla retorno de aire situada en pared
	VC-T*	C	Techo zona central
Almacén D	AL-S	D	Suelo, zona central
	AL-PP*	D	Pomo de puerta acceso a Distribuidor (desde almacén)
	AL-P1*	D	Pared tras cámara refrigeradora
	AL-T*	D	Techo zona central
Distribuidor	DI-S	D	Suelo, zona central

Material y Métodos

	DI-PP*	D	Pomo de puerta acceso a Vestuario C (desde Distribuidor)
	DI-T*	D	Techo zona central
Vestuario D	VD-S	D	Suelo, zona central
	VD-PP*	D	Pomo de puerta acceso a Distribuidor (desde Vestuario D)
	VD-T*	D	Techo zona central

Tabla 19. Puntos de muestreo de superficies mediante placas de contacto. *Puntos de control adicionales en los muestreos mensuales.

La cantidad de puntos de muestreo se resumen en la tabla 20.

	Volumétrico de aire	Sedimentación	Superficies por contacto	
	Semanal y mensual		Semanal	Mensual
SP1	3	5	12	19
SP2	3	5	12	19
SP3	2	2	8	13
Vestuario B	1	1	2	7
Vestuario C	1	1	1	4
Almacén	1	1	1	4
Distribuidor	1	1	1	3
Vestuario D	1	1	1	3

Tabla 20. Resumen de puntos de muestreo de partículas viables

4.4.1.a.1. Identificación de microorganismos

Las cepas aisladas en cada uno de los muestreos realizados en grado A se identificaron a partir del medio fresco mientras que las cepas aisladas en los controles ambientales en grado B se criopreservaron para su posterior identificación.

Criopreservación de cepas aisladas en los controles ambientales

Las colonias aisladas se resuspendieron en medio de conservación-congelación (MCC, MAIM S.L., Barcelona, España) y se mantuvieron a -20 °C hasta su descongelación.

Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Identificación de cepas.

Tras descongelar a temperatura ambiente los microorganismos criopreservados, se sembraron en placas de medio agar sólido TSA para obtener colonias aisladas. Los medios sembrados se cultivaron un máximo de 7 días a 30-35 °C para obtener un cultivo puro y proceder a su identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) por el Departamento de Microbiología del Hospital Regional Universitario de Málaga.

Se tomó una colonia a partir de cultivo fresco en medio de agar sólido TSA y se depositó sobre un pocillo de la tarjeta metálica (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), dejándola secar a temperatura ambiente, posteriormente se cubrió con 1 µl de solución

Material y Métodos

de HCCA matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) y se dejó secar para su posterior análisis con MALDI-TOF MS. El espectro fue adquirido en un modo lineal de iones positivos a una frecuencia de láser de 60 Hz a través de una relación masa/carga (m/z) de 2.000 a 20.000 Da, usando Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania). El perfil proteico se obtuvo mediante el software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y se analizó mediante el programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

Para la calibración del espectrómetro se utilizó como estándar el perfil proteico de una cepa de *Escherichia coli* DH5 (BTS; (Bruker Daltonics). Se utilizó la librería MBT compass library v 6.0 que contiene 6903 perfiles proteicos de bacterias.

4.4.1.b. Análisis de Riesgos

En noviembre de 2012 se procedió a realizar el Análisis de Riesgos teniendo en cuenta los resultados previos y el conocimiento adquirido hasta el momento sobre los procedimientos implantados.

Las posibles fuentes de contaminación en el área clasificada se muestran en la figura 19.

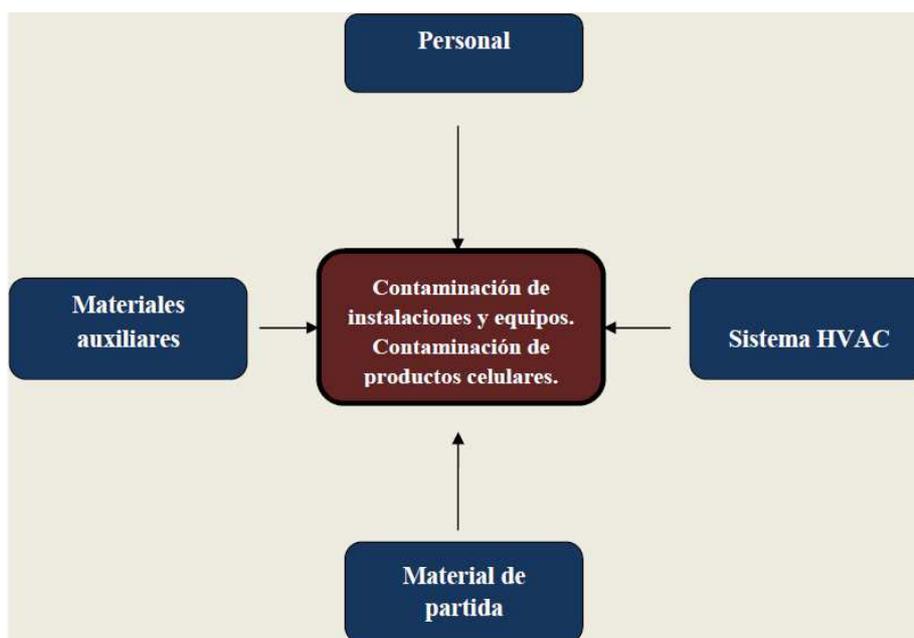


Figura 19. Posibles fuentes de contaminación en el área clasificada.

La totalidad del proceso de fabricación de CMMAd autólogas se analizó desde el punto de vista del riesgo de biocontaminación utilizando la herramienta de **análisis HACCP**. Mediante el uso de esta herramienta se intentó establecer cuáles eran las posibles fuentes de biocontaminación y las medidas disponibles para minimizar el riesgo.

En general, los pasos a destacar en este tipo de análisis son [121]:

- Identificar los riesgos de contaminación y su severidad o peligrosidad.

Material y Métodos

- Determinar los puntos de control críticos (PCC).
- Establecer los límites de aceptación.
- Establecer un sistema para monitorizar y controlar los PCC.
- Asignar las acciones correctoras cuando un PCC no se encuentra bajo control.
- Establecer procedimientos de verificación que confirmen que sistema funciona adecuadamente.
- Documentar los resultados mediante la generación de los correspondientes informes.

La Organización Mundial de la Salud, en el Codex Alimentarius [122], define un punto crítico de control (PCC) como "una etapa donde se puede aplicar un control y que sea esencial para evitar o eliminar un peligro para reducirlo a un nivel aceptable".

Si se identifica un peligro y no hay ninguna medida de control para esa etapa o en cualquier otra, entonces el producto o el proceso debe ser modificado en dicha etapa, o en una etapa anterior o posterior, con el fin de incluir una medida de control para ese peligro concreto.

La determinación de un PCC con la herramienta HACCP puede facilitarse mediante la aplicación de un árbol de decisiones, como la incluida en las Directrices para la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control HACCP del Codex, que hace un abordaje de razonamiento lógico.

En este sentido, se analizaron los procesos, las actividades de riesgo realizadas en cada uno de ellos, los riesgos reales generados, y las medidas de control establecidas, para evaluar, según el anexo VI, si se trataba de un PCC o no. Este análisis se realizó para cada una de las potenciales Fuentes de Contaminación establecidas:

- Personal (Figura 20 y tablas 21 y 22).
- Materiales auxiliares (Figura 21 y tabla 23).
- Material de partida (Figura 22 y tabla 24).
- Sistema HVAC (Figura 23 y tabla 25).

A. Fuente de contaminación: personal

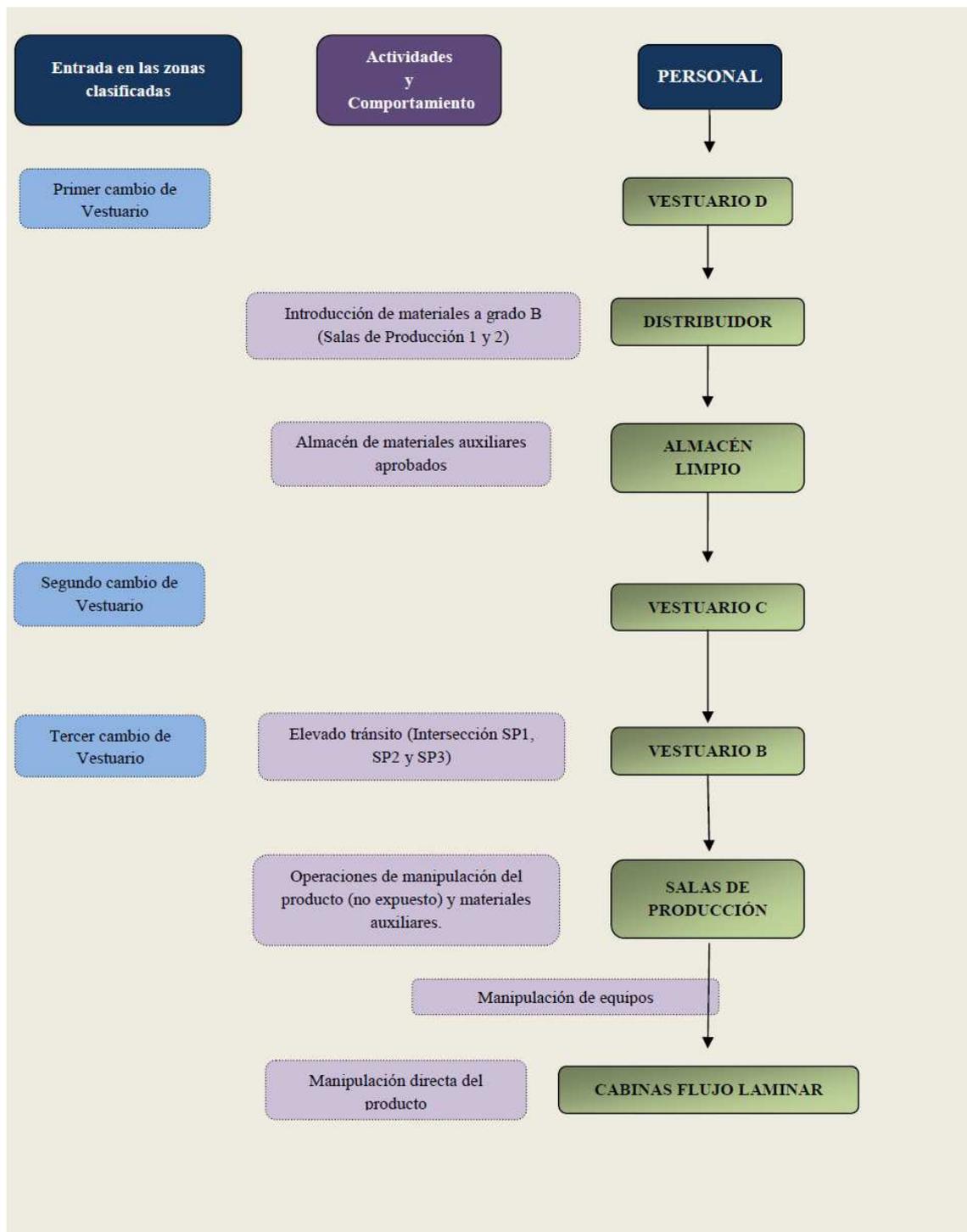


Figura 20. Actividades, comportamiento y flujos de entrada de personal que pueden suponer un riesgo de biocontaminación.

PROCESO DE ENTRADA AL ÁREA CLASIFICADA					
Proceso	Análisis Riesgos (Actividad realizada)	Riesgo generado	Medidas de control	¿Es un PCC? (Anexo VI)	Código PCC
Primer cambio de Vestuario (Vestuario D).	Entrada al área con: <ul style="list-style-type: none"> • Pijama/bata no estéril; • gorro quirúrgico; • zuecos no estériles cubiertos con cubre calzas; • sin guantes. Colocación de traje de baja liberación de partículas y guantes no estériles.	Contaminación de aire ambiente y suelo por partículas de descamación de la piel y partículas procedentes de vestimenta no estéril. Ambiente en contacto momentáneo con ambiente no clasificado (apertura de puerta de entrada).	Sobrepresión de Vestuario D respecto al exterior. Alfombra adhesiva en entrada del Vestuario D y Distribuidor. Reducción de la cantidad de superficie corporal expuesta y del tiempo de exposición. Se modifica el procedimiento de entrada: al Vestuario D se accederá con el traje de baja liberación de partículas en caso de acceder posteriormente a zonas de grado C. Formación de personal. Aseptización de guantes antes de acceder a Distribuidor. Limpiezas periódicas (semanales y mensuales).	P1(si)/P2(si) SI PCC	1
Segundo cambio de Vestuario (Vestuario C).	Entrada al área con traje de baja liberación de partículas. Sustitución de guantes no estériles por guante estériles. Colocación de mascarilla estéril.	Contaminación de aire ambiente y suelo por partículas de descamación de la piel, y partículas procedentes de vestimenta no estéril (traje de baja liberación de partículas) y zuecos con cubre calzas no estériles.	Eliminación de cubre calzas usados en grado D (uso de nuevos). Evitar contacto de materiales y estanterías con manos desnudas (eliminación de guantes no estériles y colocación de primer par de guantes estériles). Formación de personal. Colocación de máscara y guantes estériles. Aseptización de guantes.	P1(si)/P2(si) SI PCC	2
Tercer cambio de Vestuario (Vestuario B).	Colocación de mono y cubre botas estériles (“en zona sucia”). Colocación de segundo par de guantes estériles (“en zona limpia”).	Contaminación de aire ambiente y suelo en zona “sucia” por liberación de partículas procedentes de vestimenta no estéril (traje de baja liberación de partículas). Contaminación de primer par de guantes estériles durante la colocación de mono y cubre botas. Contaminación de segundo par de guantes estériles.	Aseptización del banco antes de depositar el mono y segundo par de guantes estériles. Adecuado proceso de manipulación y colocación de mono estéril. Formación de personal. Colocación de segundo par de guantes estériles Aseptización de guantes antes de realizar alguna actividad en las Salas de Producción.	P1(si)/P2(si) SI PCC	3

Tabla 21. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos de Control para la entrada al área clasificada.

ACTIVIDADES REALIZADAS Y COMPORTAMIENTO DEL PERSONAL					
Sala	Análisis Riesgos (Actividad realizada)	Riesgo generado	Medidas de control	¿Es un PCC? (Anexo VI)	Código CPP
Vestuario D.	Anotación en libro de registro de la temperatura y presión de las instalaciones. Tránsito hacia zonas de mayor clasificación.	Biocontaminación de superficies y aire ambiente por partículas de descamación de la piel y vestimenta no estéril.	Vestuario según normas de entrada.	P1 (si)/P2 (no)/P3 (si)/P4 (si, limpieza periódica) NO PCC	-
Distribuidor.	Zona de paso hacia el Almacén GMP y Vestuario C.	Biocontaminación de superficies y aire ambiente por partículas de descamación de la piel y vestimenta no estéril.	Uso de traje de baja liberación de partículas en caso de acceso a Vestuario C.	P1(si)/P2(si) SI PCC	4
Distribuidor.	Limpieza y aseptización de materiales auxiliares e instrumentos para introducirlos a través de los SAS a grado A/B. Zona de tránsito.	Biocontaminación de superficies y aire ambiente del Distribuidor por partículas de descamación de la piel, y vestimenta no estéril.	Uso de traje de baja liberación de partículas para realizar el proceso de limpieza/desinfección e introducción de materiales a través de los SAS.	P1(si)/P2(si) SI PCC	4
		Biocontaminación de segundo par de guantes estériles (en Salas de Producción) por insuficiente desinfección del material introducido.	Aseptización y cambio periódico de guantes. Procedimiento validado para la introducción de materiales auxiliares.	P1 (si)/P2 (no)/P3 (si)/P4(si, aseptización y cambio periódico de guantes) NO PCC	-
		Biocontaminación de superficies grado B (arrastre de partículas viables).	Procedimiento validado para la introducción de instrumentos y materiales auxiliares.	P1(si)/P2(si) SI PCC	5
		Biocontaminación de superficies en grado A (materiales no doble o triple embolsados e introducidos en grado A).	Re-aseptización de materiales antes de ser introducidos en grado A.	P1(si)/P2(si) SI PCC	6
Almacén GMP.	Clasificación y conservación de material fungible en estanterías de acero inoxidable y cámara refrigeradora.	Biocontaminación de superficies y ambiente en Almacén. Contaminación de materiales auxiliares que posteriormente serán	Entrada a Almacén con bata o pijama quirúrgico. Cabellos cubiertos, guantes no estériles y calzas. Prohibida la entrada de envoltorios de papel/cartón. Aseptización de materiales auxiliares antes de ser almacenados en	P1(si)/P2(si) SI PCC	7

		introducidos en grado A y B.	Almacén GMP.		
Vestuario B	Zona de tránsito hacia y entre las diferentes Salas de Producción.	Biocontaminación de superficies y ambiente. Arrastre posterior a Salas de Producción.	Colocación de mono y cubre botas estériles. Normas de comportamiento en áreas clasificadas.	P1(si)/P2(si) SI PCC	3
Salas de Producción.	Manipulación de cultivos celulares, equipos, aseptización e introducción de materiales en grado A.	Biocontaminación de superficies (mesa, microscopio, centrifuga, sillas...) y ambiente en grado B. Arrastre posterior a grado A.	Vestimenta integral estéril y observación de normas de comportamiento en áreas clasificadas.	P1(si)/P2(no)/P3(si)/P4 (si, limpieza periódica) NO PCC	-
	Introducción de factorías de cultivo en los incubadores de CO ₂ . Incubación de cultivos celulares.	Biocontaminación de bandejas de agua de los incubadores. Diseminación desde ésta a factorías de cultivo.	Apertura de puertas de incubadores durante el tiempo imprescindible. Cambios periódicos del agua de las bandejas. Uso de agua estéril. Limpieza “entre lotes” interior de los incubadores.	P1(si)/P2(si) SI PCC	8
	Introducción de flask, factorías, medios de cultivo, pipetas y demás material en CFL (Grado A).	Biocontaminación de superficies de CFL.	Re-aseptización de materiales auxiliares. Flujo de aire laminar controlado en la CFL. Normas de comportamiento en áreas clasificadas. Aseptización y cambio de guantes periódico (cada 90 minutos).	P1(si)/P2(si) SI PCC	6
Personal auxiliar de la UPC.	Personal encargado de la limpieza, mantenimiento y cualificación de instalaciones y/o equipos.	Biocontaminación de instalaciones.	Formación inicial y continuada en cuanto a normas de vestuario y comportamiento en áreas clasificadas. Personal de limpieza: formación en procedimientos de limpieza en áreas clasificadas. Limpiezas de las CFL (grado A) exclusivamente realizadas por personal de producción.	P1(si)/P2(si) SI PCC	9
Limpieza Periódica	<i>Semanal:</i> realizada por 2 personas (suelos y superficies de trabajo). <i>Mensual:</i> realizada por 4 personas (paredes, suelos y superficies de trabajo).	Biocontaminación de instalaciones por actividades propias de las labores de limpieza.	Formación: <ul style="list-style-type: none"> • procedimientos de limpieza en áreas clasificadas. • normas de vestuario y comportamiento en áreas clasificadas. • microbiología básica. 	P1(si)/P2(si) SI PCC	10

Tabla 22. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos de Control de la contaminación generada por la presencia de personal.

B. Fuente de contaminación: materiales auxiliares.

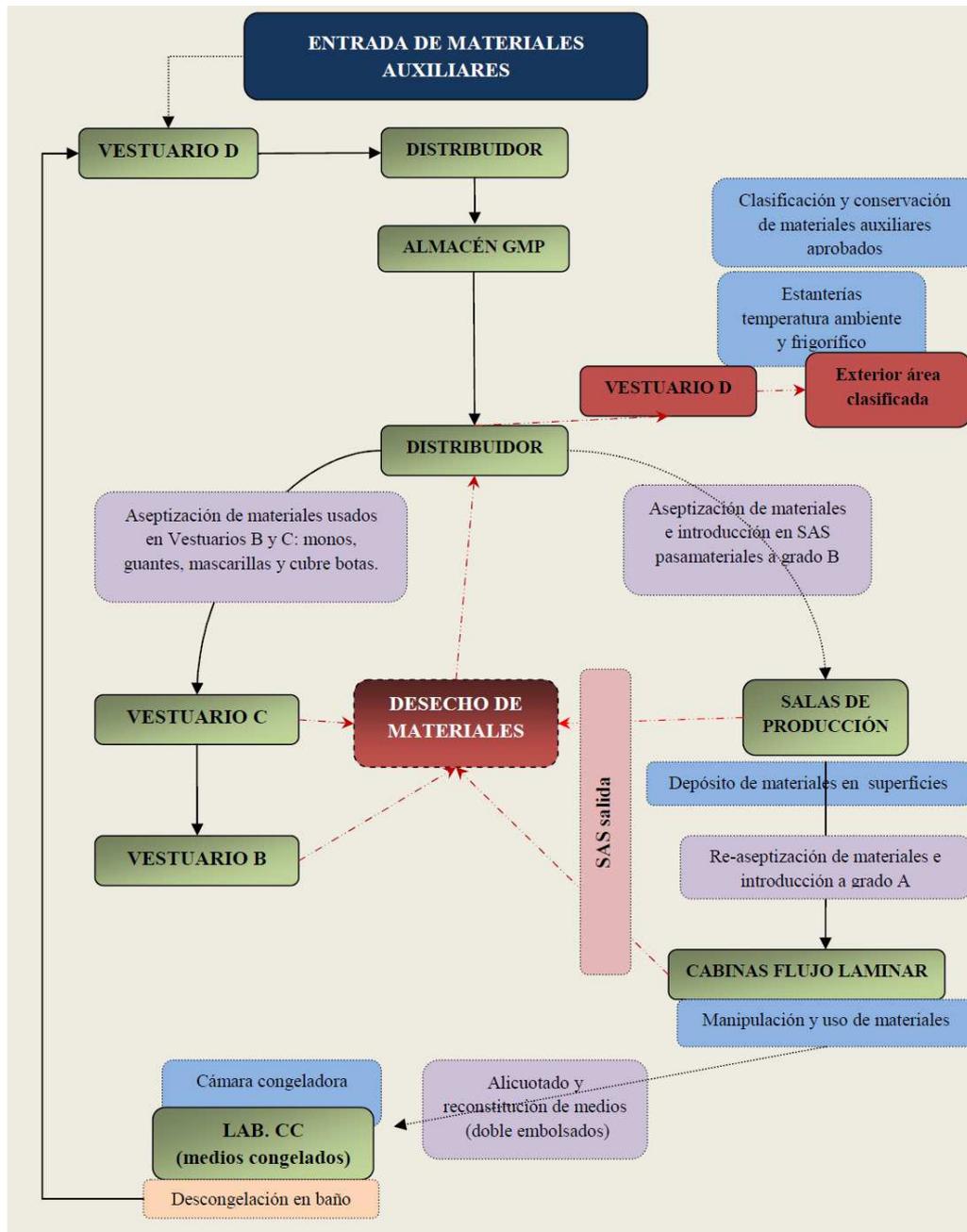


Figura 21. Flujos de entrada y de salida de los materiales auxiliares que pueden suponer un riesgo de biocontaminación.

MATERIALES AUXILIARES					
Sala	Análisis Riesgos (Actividad realizada)	Riesgo generado	Medidas de control	¿Es un PCC? (Anexo VI)	Código CPP
Vestuario D y Distribuidor	Tránsito de materiales auxiliares aprobados hacia el Almacén.	Contaminación asociada a los materiales introducidos en el área y almacenados en el Almacén GMP.	Aseptización previa a su introducción. Prohibida la entrada de papel/cartón.	P1(si)/P2(si) NO PCC	1/4
Almacén.	Operaciones de clasificación y conservación de material fungible en estanterías de acero inoxidable.	Biocontaminación de superficies y ambiente. Contaminación de materiales auxiliares.	Vestuario adecuado. La superficie expuesta del material ha de ser de plástico o similar. Materiales con superficies como papel/cartón/celulosa (jeringas y agujas por ejemplo) han de ser embolsados. Monitorización de temperatura.	P1(si)/P2(si) SI PCC	7
Laboratorio de Control de Calidad.	Descongelación de medios en baño termostatzado y posterior entrada a Salas de Producción a través de los SAS pasamateriales.	Contaminación de superficies exteriores de los envases de medios de cultivo en el baño termostatzado.	Doble embolsado de medios congelados, desecho de segunda envuelta tras estar en contacto con el agua del baño. Cambio periódico de agua de baño.	P1(si)/P2(si) SI PCC	5
Distribuidor	Limpieza y aseptización de materiales auxiliares para introducirlos en los SAS pasamateriales hacia las Salas de Producción.	Biocontaminación de SAS pasamateriales.	Procedimiento validado de introducción de materiales. Limpieza de superficie de SAS antes de su utilización. Limpieza semanal y mensual de SAS pasamateriales. Cualificación periódica de SAS pasamateriales.	P1(si)/P2(si) SI PCC	5/6
Salas de Producción	Entrada de materiales a través de los SAS.	Contaminación de superficies en grado B: carrito y mesa (depósito de materiales).	Procedimientos de limpieza diaria, semanal y mensual. Procedimiento validado de introducción de materiales a través de los SAS.	P1(si)/P2(si) SI PCC	5
	Introducción de flask y factorías de cultivo en los incubadores de CO ₂ .	Biocontaminación de bandejas de agua de los incubadores. Diseminación a las factorías de cultivo y zonas colindantes.	Aseptización de flask/factorías de cultivo antes de su introducción en los incubadores. Cambios periódicos del agua de las bandejas.	P1(si)/P2(si) SI PCC	8

	Incubación de cultivos celulares.		Limpieza “entre lotes” del interior de los incubadores.		
	Rotura de medios de cultivo en grado B.	Derrame de medios de cultivo que pueden nutritivos y favorecer el crecimiento de microorganismos.	Procedimiento de limpieza en caso de derrames.	P1(si)/P2(no)/ P3(si)/P4(si, limpieza) NO PCC	-
Cabinas de flujo laminar.	Introducción de flask, factorías, medios de cultivo, pipetas y demás material en CFL (Grado A).	Biocontaminación de superficies de CFL.	Aseptización de materiales antes de su introducción en las CFL. Limpieza y aseptización UV tras uso.	P1 (si)/P2 (Si) SI PCC	6
	Rotura de medios de cultivo en el interior de CFL.	Derrame de medios de cultivo que pueden ser la base para el desarrollo de microorganismos.	Procedimiento de limpieza en caso de derrames.	P1(si)/P2(no)/P3(si) /P4(si, limpieza) NO PCC	-
	Reconstitución y alicotado de medios.	Contaminación de medios durante el alicotado.	Monitorización de proceso en grado A*. Aseptización de materiales antes de su introducción en las CFL.	P1(si)/P2(Si) SI PCC	11
Vestuario C.	Introducción en Vestuario C de los materiales necesarios para los cambios de vestuario (guantes estériles, mascarillas y monos).	Contaminación de estanterías y superficies.	Aseptización de envuelta externa de materiales antes de su introducción en los Vestuarios.	P1(No)/No NO PCC	-
Vestuario B.	Introducción en Vestuario B de los materiales necesarios para los cambios de Vestuario (guantes estériles, monos y cubre botas).	Contaminación de estanterías y superficies.	Apertura en Vestuario C de la cubierta exterior de los monos estériles y cubre botas (en Vestuario B se introducen con envuelta estéril).	P1(No)/No NO PCC	-
Almacén, Vestuario D, Distribuidor.	Entrada de personal y materiales en zonas de baja clasificación. Proximidad a ambiente exterior no clasificado.	Entrada de insectos en las instalaciones.	Instalación de insectocutores en Vestuario D. Colocación de trampas insecticidas a nivel de suelo en la áreas de grado D.	P1(si)/P2(Si) SI PCC	12

*Tabla 23. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos para el Material Auxiliar. * Monitorización en Grado A: muestreo continuo de partículas totales mediante contador óptico de partículas, muestreo continuo de partículas viables mediante placas de sedimentación, control de personal al finalizar el proceso mediante impronta de guantes y control de superficies críticas de la cabina de flujo laminar mediante placas de contacto.*

C. Fuente de contaminación: material de partida.

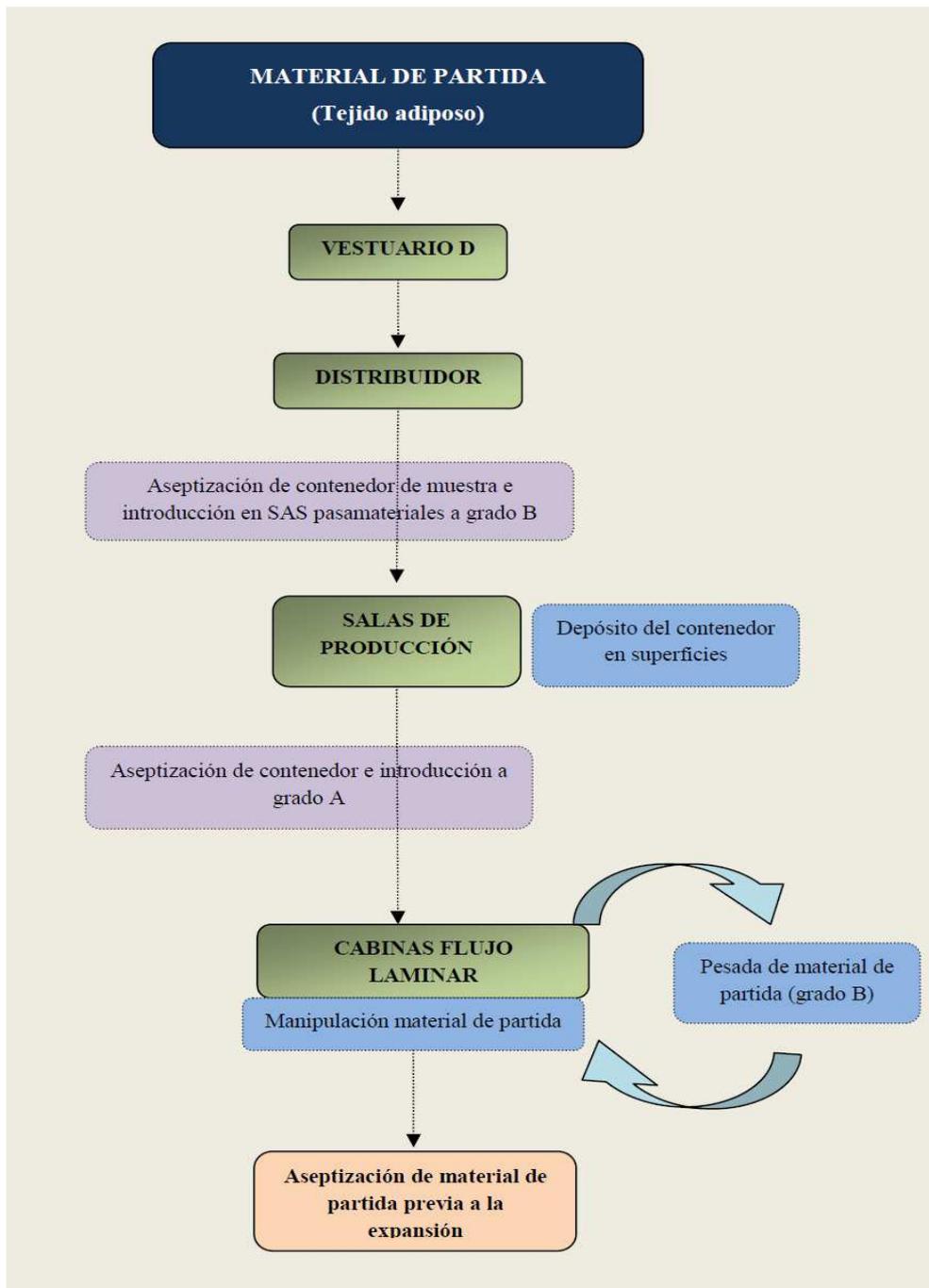


Figura 22. Flujos de entrada y actividades sobre el Material de Partida que pueden suponer un riesgo de biocontaminación.

MATERIAL DE PARTIDA					
Sala	Análisis Riesgos (Actividad realizada)	Riesgo generado	Medidas de control	¿Es un PCC? (Anexo VI)	Código CPP
Distribuidor y Salas de Producción.	Depósito de contenedor que previamente ha estado en zona no clasificada (mesa, carro).	Ver introducción de materiales desde el Distribuidor. (Epígrafe anterior)	Ver introducción de materiales desde el Distribuidor. (Epígrafe anterior)	-	-
Cabinas de flujo laminar (grado A)	Manipulación de material de partida, eliminación de suero estéril usado para transporte. Disgregación mecánica del tejido adiposo. Presencia de microorganismos en el material de partida (principalmente microbiota saprofita epitelial).	Salpicaduras/derrame hacia las superficies de la CFL. Transmisión de la biocontaminación a los cultivos celulares.	<ul style="list-style-type: none"> Serología inicial al paciente (HIV I+II, Hepatitis B y C, sífilis). Descontaminación de tejidos con solución de lavado* Control de contaminación de tejidos Monitorización de proceso en grado A. Limpieza tras uso de la CFL.	P1(si)/P2(Si) SI PCC	6/19
	Reutilización de equipos.	Contaminación cruzada (microbiológica) entre lotes	En cada CFL e incubador de CO ₂ sólo se fabricará un lote de medicamento durante el mismo período de tiempo. No se compartirá ningún tipo de instrumentación para distintos lotes de producto (micropipetas, pipettus, etc.) sin haber realizado una limpieza exhaustiva “entre lotes”.	P1(si)/P2(Si) SI PCC	6
Balanza de precisión grado B.	Pesada (en balanza de precisión ubicada en grado B) del material de partida.	Contaminación de superficie del plato de la balanza con partículas viables a partir del contenedor de material de partida.	Uso de contenedor estéril para la tara de la balanza.	P1(No)/P2(No) NO PCC	-

Tabla 24. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos para el Material de Partida. *Solución de lavado: solución que se prepara en grado A justo antes de la disgregación mecánica del tejido. Esta solución contiene una solución de gentamicina (160 µg/ml) y vancomicina (40 µg/ml) en PBS.

D. Fuente de contaminación: sistema HVAC.

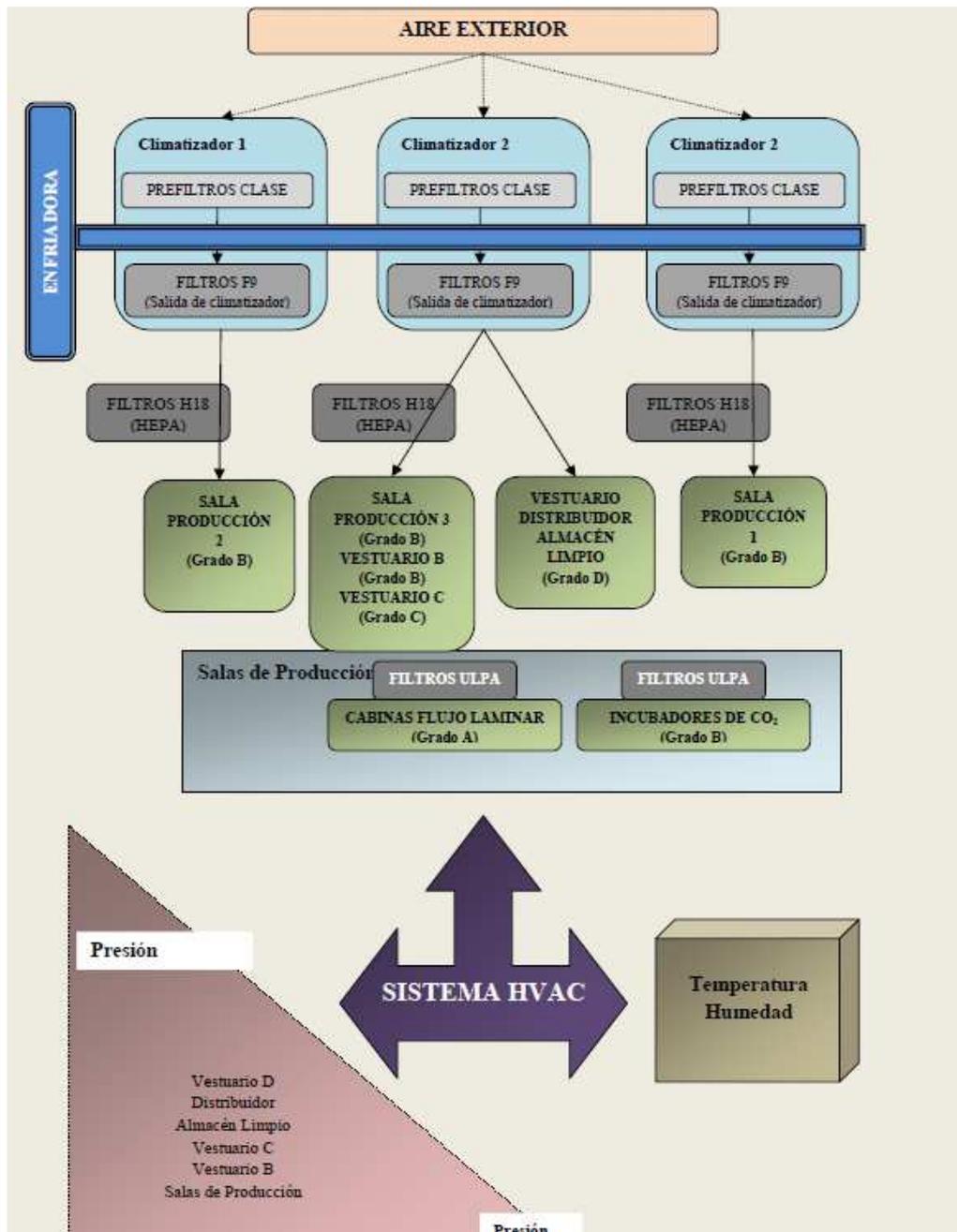


Figura 23. Circulación del aire a través del sistema HVAC. Puntos y parámetros que pueden suponer un riesgo de biocontaminación.

SISTEMA HVAC					
Elemento	Análisis Riesgos (Actividad realizada)	Riesgo generado	Medidas de control	¿Es un PCC? Anexo VI	Código CPP
Enfriadora.	Mantenimiento de las condiciones de temperatura y humedad establecidas.	Elevación de temperatura y humedad: aumento la probabilidad de proliferación de microorganismos.	Cualificación anual HVAC y mantenimiento periódico. Sistema informático de monitorización de alarmas. Control diario de temperatura Almacén GMP y nevera de almacén.	P1(si)/P2(Si) SI PCC	13/14
					18
Pre-filtros Clase G4. Todos los climatizadores.	Filtrado de aire exterior. Primer nivel.	Posibilidad de colapso de filtros F9 y H14 (HEPA).	Cualificación anual HVAC y mantenimiento periódico. Sistema informático de monitorización de alarmas.	P1(si)/P2(Si) SI PCC	15/16
Filtros F9. Todos los climatizadores.	Filtrado de aire exterior. Segundo nivel.	Posibilidad de colapso filtros H14 (HEPA).	Cualificación anual HVAC y mantenimiento periódico. Sistema informático de monitorización de alarmas		
Filtros H14 (HEPA). Terminales en Salas de Producción, Vestuario B y C.	Filtración absoluta en Salas de Producción, Vestuarios B y C.	Fugas en los filtros, pérdida de la capacidad de filtración absoluta. Colapso de filtro y disminución de caudal de impulsión, disminución del número de renovaciones/hora. Aumento de la concentración de partículas.	Cualificación anual HVAC y mantenimiento periódico de los pre-filtros y filtros F9. Control de cumplimiento continuo semestral según ISO 14644-2 (clase ISO ≤ 5).		
Filtros ULPA: Cabinas de flujo laminar (Grado A).	Filtración absoluta en cabinas de flujo laminar.	Aumento de la biocontaminación en caso de fugas en los filtros. Colapso de filtro y disminución de caudal de impulsión. Aumento de la concentración de partículas. Exposición directa del producto al ambiente en grado B.	Monitorización de proceso en grado A. Alarmas de velocidad de impulsión en CFL. Cualificación anual del equipo y mantenimiento periódico. Control de cumplimiento continuo semestral según ISO 14644-2 (clase ISO ≤ 5).	P1(si)/P2(Si) SI PCC	11
Presión diferencial.	Contención de la entrada de aire en salas con mayor presión diferencial.	Entrada de biocontaminación en las instalaciones. Pérdida de barrera de contención.	Cualificación anual HVAC y mantenimiento periódico. Control diario de presión.	P1(si)/P2(Si) SI PCC	17

Tabla 25. Aplicación del Sistema de Análisis de Puntos Críticos para el Sistema HVAC.

4.4.2. *Implantación del Plan de Control de la Contaminación Ambiental*

4.4.2.a. *Medida 1: Cambios en Controles ambientales periódicos (semanales y mensuales)*

Muestreo volumétrico de aire

Se diferenciaron dos tipos de muestreos ordinarios: muestreo semanal y mensual (tabla 26), a diferencia del único tipo de muestreo anterior. Las principales diferencias con el anterior plan de muestreo resultaron:

- Supresión de los puntos de muestreo volumétrico de aire en el interior de las cabinas de flujo laminar.
- El muestreo semanal no incluye áreas de riesgo menor. En el caso del Vestuario B, debido a que se realizan muestreos en el mismo grado en las 3 Salas de Producción contiguas. En el caso del Distribuidor, se realizan muestreos en el mismo grado en las salas de grado D colindantes (Almacén GMP y Vestuario D). Ambos puntos fueron, sin embargo, incluidos en el muestreo mensual.

Sala	Referencia	Clasificación	Descripción del punto de muestreo
SP1	A-SP1	B	Punto central de sala. Altura de trabajo
SP2	A-SP2	B	Punto central de sala. Altura de trabajo
SP3	A-SP3	B	Punto central de sala. Altura de trabajo
Vestuario B	A-VB*	B	Punto central de sala. Sobre el banco.
Vestuario C	A-VC	C	Punto central de sala. Suelo.
Distribuidor	A-DI*	D	Punto central de sala. Suelo.
Almacén D	A-AL	D	Punto central de sala. Suelo.
Vestuario D	A-VD	D	Punto central de sala. Suelo.

Tabla 26. Nueva localización de los puntos de muestreo volumétricos.*Puntos de muestreo adicionales del muestreo mensual.

Un plano de la instalación detallando los puntos de muestreo volumétrico semanales y mensuales se detalla en los anexos VII y VIII.

Muestreo por sedimentación de partículas viables

Se suprimen todos los puntos en los muestreos ambientales periódicos. Se mantiene según lo indicado en el Anexo 1 de las NCF la monitorización de todas las actividades realizadas en grado A mediante ésta técnica.

Muestreo de superficies mediante placas de contacto

Los puntos establecidos se relacionan en la tabla 27.

Sala	Referencia	Clasificación	Descripción del punto de muestreo
SP1	CFL-01c	A	Superficie central bandeja de trabajo. Interior CFL-01
	CFL-01i*	A	Superficie izquierda bandeja de trabajo. Interior CFL-01
	CFL-02c	A	Superficie central bandeja de trabajo. Interior CFL-02
	CFL-02i*	A	Superficie izquierda bandeja de trabajo. Interior CFL-02
	SAS-01e	B	Superficie basal interior SAS-01 entrada de material
	SP1-ME	B	Superficie mesa microscopio
	SP1-CAR	B	Superficie bandeja superior carrito
	SP1-Mat#	B	Punto variable. Material o equipo.
	SP1-MC	B	Suelo, punto de máxima circulación de sala
	SP1-P*	B	Pared tras incubadores
SP2	CFL-03c	A	Superficie central bandeja de trabajo. Interior CFL-03
	CFL-03i*	A	Superficie izquierda bandeja de trabajo. Interior CFL-03
	CFL-04c	A	Superficie central bandeja de trabajo. Interior CFL-04
	CFL-04i*	A	Superficie izquierda bandeja de trabajo. Interior CFL-04
	SAS-02e	B	Superficie basal interior SAS-02 entrada de material
	SP2-ME	B	Superficie mesa microscopio
	SP2-CAR	B	Superficie bandeja superior carrito
	SP2-Mat#	B	Punto variable. Material o equipo.
	SP2-MC	B	Suelo, punto de máxima circulación de sala
	SP2-P*	B	Pared tras incubadores
SP3	CFL-05c	A	Superficie central bandeja de trabajo. Interior CFL-05
	CFL-05i*	A	Superficie izquierda bandeja de trabajo. Interior CFL-05
	SAS-03*	B	Superficie basal interior de comunicación SP3-SP1
	SAS-04*	B	Superficie basal interior de comunicación SP3-SP2
	SAS-05*	B	SAS de salida
	SP3-ME	B	Superficie mesa de trabajo
	SP3-MC	B	Suelo, punto de máxima circulación de sala
	SP3-P*	B	Pared tras CFL-05
Vestuario B	VB-B	B	Superficie superior banco separación "zona limpia/zona sucia"
	VB-S	B	Suelo, "zona sucia"
	VB-P*	B	Puerta con Vestuario C
Vestuario C	VC-S	C	Suelo, zona central
	VC-Est*	C	Estantería de material usado en vestimenta
Almacén GMP	AL-S	D	Suelo, zona central
	AL-Est*	D	Estantería de material fungible aprobado.
	AL-P*	D	Pared tras cámara refrigeradora
Distribuidor	DI-S	D	Suelo, zona central
	D-CAR	D	Superficie bandeja superior carrito usado para apoyar materiales
	DI-Pomo*	D	Pomo de puerta acceso a Vestuario C (desde la cara Distribuidor)

Vestuario D	VD-S	D	Suelo, zona central
	VD-Pomo*	D	Pomo de puerta acceso a Distribuidor (desde la cara Vestuario D)

Tabla 27. Nuevos puntos para muestreo de superficies tras Análisis de Riesgos. *Puntos de muestreo adicionales en el muestreo mensual. #La elección de este punto se realizará por el personal de control de calidad con el fin de detectar puntos de contaminación no controlados habitualmente. Los puntos a muestrear pueden ser materiales introducidos al área clasificada con el fin de comprobar la adecuada desinfección de materiales introducidos o bien superficies o equipos.

El plano con las localizaciones de los muestreos mediante placas de contacto se muestra en el anexo IX (semanales) y X (mensuales).

4.4.2.b. Medida 2: Cambios en la Monitorización de procesos en grado A

La monitorización de procesos de fabricación aséptica se realizó mediante placas de sedimentación (durante toda la duración del proceso), control de impronta de guantes (cinco dedos de ambas manos en placas diferentes) y, muestreo de la superficie de trabajo al finalizar la actividad (mediante placa de contacto), así como monitorización de partículas totales.

Los procesos así controlados pasaron a ser: procesamiento de materiales de partida, subcultivos celulares, envasado y alicuotado de medios. El único proceso no monitorizado microbiológicamente a partir de entonces (aunque se realizó la monitorización de partículas totales) fue el cambio de medio de cultivo. Esta decisión se basó en la escasa criticidad del proceso debida a la escasa manipulación y corta duración y a que, tras el análisis de resultados de la primera etapa, el 100% de los procesos de cambio de medio habían dado 0 ufc en todos los tipos de muestreo.

4.4.2.c. Medida 3: Modificaciones en las Cualificaciones del sistema HVAC y Cabinas de Flujo Laminar

Se añadieron las “demostraciones del cumplimiento continuo” de clase en grados A y B según la norma ISO 14644-2, semestralmente y, en todos los grados, anualmente. Los ensayos semestrales se realizaron por el personal de la UPC: recuento de partículas “en reposo” y “en funcionamiento” utilizando uno de los contadores ópticos de partículas de la UPC.

Las recualificaciones anuales clásicas (ensayos de integridad y velocidad de impulsión filtros terminales, caudal y renovaciones por hora, recuperación de clase, humedad, temperatura, presiones diferenciales) del sistema HVAC y de las CFL se subcontrataron con una empresa especializada.

4.4.2.d. Medida 4: Realizar la Cualificación microbiológica de la instalación.

Con estos ensayos se pretendió demostrar que el área analizada alcanza la clasificación requerida para la sala en condición “en funcionamiento”. El cumplimiento con los requisitos de biocontaminación ambiental para las zonas de ambiente controlado en las NCF se verificó mediante la realización y documentación de los ensayos:

- Muestreo volumétrico de aire (muestreo activo).
- Muestreo pasivo de aire, sedimentación de partículas viables.
- Control de superficies:
 - Suelos y paredes.
 - Equipos.
- Control de Personal.
- Capacidad desinfectante de los SAS pasamateriales (capacidad germicida UV).

En cuanto a los niveles de clasificación ambiental muestreados (A, B, C y D), en ausencia de normativa aplicable, se consideró oportuna una aproximación con las frecuencias de recualificación del sistema HVAC descritas en la norma ISO 14644-2: cada 6 meses para los grados A (CFLs) y B (SP1, 2 y 3 y Vestuario B) y anualmente para todos los grados. Por la importancia del proceso de entrada y vestimenta del personal se estimó una periodicidad de 6 meses para este control.

Los ensayos se efectuaron con el sistema HVAC en marcha, preferiblemente en períodos de uso habitual de la instalación y con el resto de equipos funcionando.

i. Localizaciones muestreos activo y pasivo de aire

Se calculó el número de localizaciones de cada sala según la raíz cuadrada de su superficie (en el caso de las cabinas de flujo laminar se realizará un único muestreo, superficie 0,8 m²). Se procuró que los puntos de muestreo se distribuyeran por toda la superficie de la sala, que estuvieran situados a la altura de la actividad de trabajo y se seleccionaron las zonas más críticas (tabla 28).

Grado	Zona	Superficie (m ²)	Puntos de muestreo volumétrico y sedimentación (N=√A)
A	CFLs	0,8	1
B	SP1	17,62	4
	SP2	13,88	4
	SP3	11,28	3
	Vestuario B	6,71	3
C	Vestuario C	3,77	2

Material y Métodos

D	Almacén	9,44	3
	Distribuidor	6,72	3
	Vestuario D	4,31	2

Tabla 28. Número y localización de los Puntos de muestreo volumétrico y sedimentación. Cualificación Microbiológica de la Instalación.

Un plano con los puntos de muestreo se presenta en el anexo XI.

Para el muestreo volumétrico se adquirió 1 m³ de aire y en los muestreos por sedimentación las placas quedaron expuestas durante 4 h.

Las placas obtenidas se incubaron en las estufas de cultivo ubicadas en el laboratorio de control de calidad durante 3 días a 20-25°C y 2 días a 30-35°C.

ii. Localizaciones muestreo de superficies: suelos y paredes.

El muestreo de superficies con placas de contacto se realizó en suelos y paredes atendiendo al área de cada una de ellas (se calculó el número de muestras mediante la raíz cuadrada de cada una de las paredes/superficies, tabla 29):

Zona		Tamaño (m ²)	Puntos de muestreo de superficies (N= \sqrt{A})
CFLs	Fondo	< 1	1
	Pared lateral	< 1	1
	Superficie de trabajo	< 1	1
SP1	Suelo	17,62	4
	Pared 1	10,92	3
	Pared 2	7,0	3
	Pared 3	4,29	2
	Pared 4	1,92	1
	Pared 5	14,95	4
	Pared 6	8,91	3
SP2	Suelo	13,88	4
	Pared 1	10,58	3
	Pared 2	5,85	2
	Pared 3	6,5	3
	Pared 4	3,51	2
	Pared 5	4,03	2
	Pared 6	2,86	2
	Pared 7	6,68	3
SP3	Suelo	11,28	3
	Pared 1	4,16	2
	Pared 2	9,36	3
	Pared 3	1,95	1

	Pared 4	14,04	4
	Pared 5	8,84	3
	Pared 6	4,68	2
Vestuario B	Suelo	6,71	3
	Pared 1	8,06	3
	Pared 2	5,98	2
	Pared 3	8,06	3
	Pared 4	5,98	2
Vestuario C	Suelo	3,77	2
	Pared 1	6,05	3
	Pared 2	4,16	2
	Pared 3	6,05	3
	Pared 4	4,16	2
Almacén GMP	Suelo	9,44	2
	Pared 1	6,24	2
	Pared 2	10,14	3
	Pared 3	6,24	2
	Pared 4	10,14	3
Distribuidor	Suelo	6,72	2
	Pared 1	10,66	3
	Pared 2	4,16	2
	Pared 3	10,66	3
	Pared 4	4,16	2
Vestuario D	Suelo	4,31	2
	Pared 1	7,02	3
	Pared 2	4,16	2
	Pared 3	7,02	3
	Pared 4	4,16	2

Tabla 29. Número y localización de los puntos de muestreo de superficie. Cualificación Microbiológica de la instalación.

Un plano con los puntos de muestreo se presenta como anexo XII.

Cantidad de muestra: una placa de TSA agar de 55 mm de diámetro (25 cm²) por punto de muestreo.

Incubación y lectura: 3 días a 20-25°C seguidos de 2 días a 30-35°C.

iii. *Localizaciones muestreo de superficies del equipamiento.*

El muestreo de equipamiento realizado durante la cualificación de la instalación tuvo como objetivo revelar el grado de biocontaminación de superficies que no eran muestreadas durante los controles periódicos semanales y mensuales con el fin de detectar puntos críticos y valorar su inclusión en los muestreos periódicos.

Material y Métodos

En las Salas de Producción, los equipos y superficies de equipos fueron los siguientes:

- *Incubadores*: agua de la bandeja (cultivo en TSB), bandeja interior y pomo de puerta.
- *CFL*: cristal exterior a la altura de la cara/frente (con cristal abierto).
- *Centrifugadoras*: botonera exterior y cubeta interior.
- *Microscopios*: objetivo ocular y pletina.
- *Balanzas*: plato de pesada.
- *Estufas con noria*: superficie basal interior.
- *SAS pasamateriales de entrada y salida*: superficie basal y rejilla del filtro de aspiración.
- *Retornos de aire*
- *Sillas*

En los Vestuarios se seleccionaron puntos habitualmente no controlados:

- *Cubierta externa de materiales de vestuario (guantes, monos, calzas, mascarillas, etc.) y estanterías*: con el fin de comprobar el adecuado grado de aseptización y los procedimientos de introducción de estos materiales al área clasificada.

En cuanto al Almacén GMP, los puntos seleccionados incluyeron:

- *Baldas de la estantería de materiales auxiliares (4 baldas)*.
- *Selección de dos materiales auxiliares*.
- *Tirador de cámara refrigeradora*.
- *Extintor/interruptor de la luz/botonera de puerta*.

En el Distribuidor se seleccionaron:

- *Carro: punto central de cada una de las dos repisas del carro*.
- *Ruedas: dos ruedas del carro*.
- *Extintor*.
- *Botonera de los SAS pasamateriales*
- *Interruptor de la luz y botonera de la puerta*.

iv. *Localizaciones muestreo de superficies: Personal.*

Se tomaron muestras del personal de UPC y del personal auxiliar de limpieza que habitualmente realiza sus funciones en el interior del área clasificada. Con el fin de verificar el adecuado proceso de entrada y colocación de la vestimenta necesaria en grado B, los muestreos se realizaron al finalizar el procedimiento de entrada, en la “zona limpia” del Vestuario B.

Las superficies muestreadas fueron: antebrazo y hombro.

v. *Criterios de aceptación cualificación microbiológica*

Grado	Criterio de aceptación
A	Todos los recuentos de los diferentes muestreos han de resultar dentro de los límites permitidos por las NCF.
	Se han de cumplir las siguientes condiciones:
	<ul style="list-style-type: none"> • Menos del 5% de las placas de los muestreos volumétricos pueden superar los límites permitidos por las NCF.
B, C y D	<ul style="list-style-type: none"> • Menos del 5% de las placas de los muestreos por sedimentación pueden superar los límites permitidos por las NCF. • Menos del 5% de las placas de los muestreos de superficies pueden superar los límites permitidos por las NCF.

vi. *Capacidad desinfectante de los SAS pasamateriales (capacidad germicida UV)*

Para obtener un cultivo puro con la suficiente cantidad de microorganismos que permitieran evaluar su poder desinfectante, se sembraron cepas adquiridas comercialmente (Bioball™, BFT, Biomerieux) y se inocularon en caldo TSB con el fin de obtener cultivos en masa. Se utilizaron cepas (en estado vegetativo) de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

Para conocer la concentración inicial (N_0), una vez realizada la suspensión de las cepas en caldo TSB, se procedió a sembrar (con asa de Digrafsky) 1 µl de cada una de las suspensiones en placas de TSA con el fin de realizar el recuento y conocer las densidades de las suspensiones. Tras 19 h a 30-35 °C los recuentos resultaron:

- *Staphylococcus aureus* 154 ufc/µl,
- *Pseudomonas aeruginosa* 121 ufc/µl y
- *Candida albicans* 146 ufc/µl.

Se sembraron inóculos de 500 µl de cada uno de los microorganismos (N_0) en 10 placas de TSA de 90 mm. Una de las placas de cada microorganismo se situó en el interior de cada uno de los SAS y se sometió a un ciclo UV con la misma duración

que en condiciones reales de trabajo (programado por defecto a 5 minutos) y la otra no, usando esta última como control positivo. El volumen del inóculo, y con ello el número de microorganismos, fue exactamente el mismo en las placas control y en las placas sometidas a UV, de forma que se pudiera comprobar la eficacia de la desinfección. Después, todas las placas se incubaron durante 18-24 horas a 30-35 °C y observó el número de ufc recuperadas (N). Se midió la eficacia de la desinfección UV mediante el cálculo de las reducciones logarítmicas conseguidas.

Criterios de aceptación:

Al menos 3 reducciones logarítmicas (99,9 % de microorganismos eliminados) en un tiempo de exposición de 5 minutos, según la fórmula:

$$\text{Log } N_0/N > 3$$

Donde, N_0 es el número de ufc/ml inicialmente inoculadas y N el número de ufc/ml que crecen tras la desinfección UV.

4.4.2.e. Medida 5: Evaluar la biocontaminación de los tejidos adiposos recibidos y de reactivos alicuotados

4.4.2.e.1. Control de la Biocontaminación de tejidos adiposos

Se evaluó la contaminación que acompaña a cada uno de los materiales de los tejidos adiposos obtenidos por exéresis quirúrgica en los quirófanos de los Hospitales participantes.

Una vez obtenidos los tejidos adiposos se introdujeron (aún en quirófano) en frascos estériles de 500 ml a los que se le añadió suero fisiológico estéril hasta cubrir por completo la pieza quirúrgica. Se enviaron inmediatamente a la UPC en equipos de transporte a una temperatura monitorizada entre 2 y 20 °C durante un máximo de 12 horas. Una vez recibidos se introdujeron en las cabinas de flujo laminar del área clasificada (grado A) donde se realizó un control de esterilidad del suero fisiológico que los rodea. Para ello, se tomaron 5 ml del líquido sobrenadante (mezcla de suero fisiológico, hematíes y tejido adiposo) y se inocularon 2,5 ml en frasco de aerobiosis (PedsPlusTM/F Culture vials, BD BactecTM) y 2,5 ml en frasco de anaerobiosis (Lytic Anaerobic/F Culture vials. BD BactecTM). Posteriormente, los tejidos se sometieron a una descontaminación con solución de lavado (solución preparada al instante y que contiene 40 µg/ml de vancomicina + 160 µg/mL de gentamicina en PBS) durante un mínimo de 60 minutos antes de comenzar con su disgregación mecánica.

Los viales de esterilidad se incubaron en el sistema BACTEC FX de la UGC de Microbiología del Hospital Regional Universitario de Málaga durante al menos 7

días a 30-35°C. Aquellos frascos en los que se detectó crecimiento mediante el sistema automatizado, se pincharon, mediante jeringa y aguja estériles, para extraer muestras y realizar pases a medios sólidos con el fin de proceder al aislamiento e identificación del microorganismo:

- Agar sangre en atmósfera de aerobiosis.
- Agar chocolate en atmósfera CO₂.
- Agar Brucella en anaerobiosis.
- Agar Sabouraud-Cloranfenicol, aerobiosis.
- Agar Mc Conkey, aerobiosis.
- Tinción de Gram.

Se incubaron hasta obtener un crecimiento que hiciera posible su identificación mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF FS (Bruker) y, a su vez, realizar un ensayo de sensibilidad a los antimicrobianos gentamicina y vancomicina que componen el medio de lavado utilizado posteriormente para desinfectar el tejido.

4.4.2.e.2. Control de la contaminación de reactivos alicuotados

El alicuotado de reactivos se realizó en grado A, en una CFL destinada exclusivamente para tal fin. Durante el proceso de alicuotado, se realizaron inóculos de 0,9 ml del medio alicuotado (utilizando la misma punta de pipeta o pipeta serológica que la usada para realizar las correspondientes alícuotas) en dos tubos de medio TSB de 9 ml por cada 10 alícuotas realizadas. La alícuota para control de biocontaminación fue siempre la número 10, a fin de que, en caso de producirse una contaminación, la última alícuota arrastre la posible contaminación ocurrida en las anteriores. Las muestras se entregaron al departamento de control de calidad y se incubaron a 20-25 °C y 30-35 °C simultáneamente durante al menos 7 días.

4.4.2.f. Medida 6: Añadir el recuento de partículas totales “en funcionamiento” en las Salas de Producción (grado B).

El anexo 1 de las NCF establece que la zona de grado B debe monitorizarse con una frecuencia y un tamaño de muestra tales que permitan detectar cualquier cambio en los niveles de contaminación y cualquier deterioro del sistema y se activen los sistemas de alarma en caso de que se excedan los límites de alerta.

El sistema implantado consistió en realizar recuentos mensuales en las Salas de Producción 1, 2 y 3 “en funcionamiento” (un punto en cada sala). La cantidad adquirida en cada punto fue de 1000 litros.

4.4.2.g. Medida 7: Incluir un control semanal del agua de los incubadores de CO₂ del área clasificada, grado B.

Los incubadores de CO₂ son estufas de cultivo celular situados en las zonas de grado B y se utilizan para la expansión y crecimiento de los cultivos celulares. Las condiciones óptimas de cultivo celular son 37±2°C, 5±1% de CO₂ y humedad superior al 95%. La elevada humedad atmosférica se genera mediante bandejas de agua colocadas en el interior de los incubadores.

Se implantó un control microbiológico semanal del agua de los incubadores situados en el interior del área clasificada: aspiración de dos alícuotas de 0,9 ml de agua con una pipeta Pasteur de plástico estéril desechable, e inoculación en dos tubos con 9 ml de medio nutritivo líquido TSB (máximo volumen de muestra inoculado con el fin de evitar que la cantidad de muestra supere el 10% de la cantidad de medio nutritivo). Posteriormente, los tubos se incubaron a 20-25°C y 30-35°C simultáneamente durante 7 días hasta la lectura visual de la turbidez del medio.

4.4.2.h. Medida 8: Control semanal del agua del baño termostatzado del laboratorio de control de calidad.

Las medidas de control establecidas inicialmente para mitigar ese riesgo fueron evitar el contacto directo del criotubo con el agua del baño (para ello el criotubo se introduce en el interior de una bolsa estéril y es ésta la que queda en contacto con el agua del baño), y aseptización de la bolsa que contiene el criotubo con alcohol 70 % antes de ser introducido en el área clasificada.

Se realizaron controles semanales del agua del baño tomando dos alícuotas de 0,9 ml de agua mediante pipeta Pasteur estéril que se inocularon en dos tubos de 9 ml de medio nutritivo líquido TSB. Los tubos se incubaron a 20-25°C y 30-35°C simultáneamente durante 7 días hasta la lectura visual de la turbidez del medio.

4.5. OBJETIVO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE BIOCONTAMINACIÓN AMBIENTAL OBTENIDOS. ANÁLISIS DE TENDENCIAS.

Con el fin de analizar las especiales características de nuestra instalación y procesos, y con el objetivo de establecer una metodología eficaz para el cálculo de los niveles de alerta y acción, se realizó un análisis retrospectivo de tendencias en los primeros meses de 2016 con los datos obtenidos desde el inicio de actividad.

Al realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov se comprobó que los datos obtenidos de los muestreos ambientales no seguían una distribución normal, por lo que el análisis de los datos realizó mediante test no paramétricos.

Se establecieron los niveles de alerta en el percentil 95 (P_{95}) y los de acción en el percentil 99 (P_{99}) [123] para cada anualidad de forma retrospectiva y se implantó este análisis de tendencias con una periodicidad anual a partir de este momento. Para el cálculo de los percentiles 95 y 99 se agruparon los resultados de las salas según el grado de clasificación ambiental. De esta forma los datos de las Salas de Producción 1, 2, 3 y Vestuario B se usaron para el cálculo de los valores en grado B; los del Vestuario C para el cálculo de los valores en grado C; los del Almacén GMP, Distribuidor y Vestuario D para los datos en grado D.

Este análisis se realizó según las recomendaciones de la norma ISO 14698-2 utilizando para ello la herramienta Excel de Microsoft. El tipo de tendencia utilizado fue la media móvil con un periodo 3.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resultados



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. RESULTADOS

5.1. OBJETIVO 1. DEMOSTRAR LA IDONEIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y MÉTODOS DE MUESTREO PARA LA MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DEL ÁREA CLASIFICADA Y LA VERIFICACIÓN DE LA ESTERILIDAD DE LOS MEDICAMENTOS FABRICADOS.

Los medios de cultivo utilizados para realizar los controles ambientales deben validarse con el fin de asegurar que son capaces de aislar los microorganismos que se esperan encontrar en un ambiente determinado; para ello, se deben comprobar las características nutritivas del medio seleccionado mediante la realización de ensayos de promoción de crecimiento. Además, se ha de verificar que los métodos de muestreo no interfieren con las mencionadas características nutritivas; en nuestro caso, se han tenido en cuenta dos factores que influyen en la capacidad de recuperación de microorganismos por parte de los medios utilizados y que son específicos de cada instalación y de los procedimientos de limpieza establecidos:

- Deshidratación de los medios utilizados para los recuentos ambientales, con la consiguiente merma en la capacidad de promoción de crecimiento, especialmente los utilizados en los muestreos de sedimentación de partículas viables.
- Capacidad de las placas utilizadas en los muestreos de superficies de neutralizar los residuos de los desinfectantes utilizados en los procedimientos de limpieza y desinfección ya que pueden interferir en el crecimiento en placa de los microorganismos. Con el fin de disminuir este efecto, habitualmente, los medios utilizados para tomar este tipo de muestras contienen sustancias neutralizantes.

5.1.1. *Ensayos de promoción de crecimiento de los medios utilizados*

Antes de iniciar la fabricación de medicamentos estériles de Terapia Celular y, posteriormente, de forma periódica, se realizaron ensayos de promoción de crecimiento a los diferentes lotes de medios de cultivo recibidos en nuestra Unidad.

i. Promoción de crecimiento en placas

En todas las placas se obtuvieron recuperaciones acordes con lo establecido en la Farmacopea Europea 2.6.12 [105]: “las recuperaciones en medios sólidos no pueden diferir en más de un factor de 2 de los valores del inóculo” (tabla 30):

$$ufc recuperadas = ufc sembradas \pm \frac{ufc sembradas}{2}$$

Resultados

Placas de CT3P

	<i>S.aureus</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>C.albicans</i>		<i>A.niger</i>	
	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.
Nov 2011	50	33	52	31	51	30	-	-	-	-
Ene 2012	50	34	52	29	51	31	-	-	-	-
Feb 2012	53	27	48	26	47	25	-	-	-	-
Feb 2013	47	48	48	41	50	51	48	49	47	47
Ene 2014	30	28	30	24	30	25	30	26	30	24
Feb 2015	49	37	48	38	47	36	49	30	50	29

Placas de TSA3

	<i>S.aureus</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>C.albicans</i>		<i>A.niger</i>	
	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.
Nov 2011	50	35	52	31	51	37	-	-	-	-
Nov 2011	50	35	52	33	51	29	-	-	-	-
Dic 2011	50	30	52	29	51	31	-	-	-	-
Feb 2012	53	33	48	29	47	27	-	-	-	-
Feb 2013	47	46	48	43	50	50	48	47	47	41
Ene 2014	30	28	30	27	30	29	30	30	30	25
Feb 2015	49	39	48	44	47	39	49	33	50	42
Nov 2015	30	28	30	15	30	21	30	30	30	28

Placas de Sabouraud

	Placas SC3P				Placas SN3P			
	<i>C.albicans</i>		<i>A.niger</i>		<i>C.albicans</i>		<i>A.niger</i>	
	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.	Sembr.	Recup.
Nov 2011	52	34	54	30	52	32	54	31
Feb 2012	50	30	48	25	50	36	48	28

Tabla 30. Promoción de crecimiento en los diferentes tipos de placas. Unidades formadoras de colonias sembradas (Sembr.) y recuperadas (Recup.)

ii. Promoción de crecimiento en medio TSB

Desde febrero de 2012 a diciembre 2015 se realizaron 16 ensayos de promoción de crecimiento a medios líquidos, tanto a los lotes de TSB previo a su uso como al medio TSB al finalizar los procesos de Simulación del Proceso de Fabricación aséptica (Media Fill). El 100% de las promociones mostraron turbidez para los 5 microorganismos ensayados.

Resultados

5.1.2. Efecto de la deshidratación sobre placas de TSA utilizadas para los muestreos volumétricos de aire y sedimentación de partículas

La capacidad de deshidratación de las placas depende fundamentalmente de la humedad ambiental, el flujo de aire y el tiempo de exposición durante los períodos de muestreo. Habitualmente se estima que, para evitar este efecto de deshidratación, las placas no deben permanecer expuestas más de 4 horas, de ahí los valores de referencia sugeridos por las NCF (ufc por cada 4 horas de exposición máxima) [39]. Sin embargo, estos periodos podrían prologarse ya que normalmente las placas destinadas a este tipo de muestreos se fabrican con volúmenes mayores de medio de cultivo con el fin de minimizar el efecto de la deshidratación sobre la capacidad de crecimiento de los microorganismos.

El objetivo fue comprobar el efecto de las condiciones ambientales reales de muestreo sobre la deshidratación de las placas de Trypticase Soja Agar 3P™ Irradiadas (TSA3, BioMérieux), utilizadas habitualmente para los muestreos por sedimentación y según el procedimiento descrito por W. Whyte [124].

Entre las colonias recuperadas se encontraron formas bacterianas y hongos miceliares (tabla 31).

Ufc recuperadas			
Localización	Placas deshidratadas 4h/Control	Placas deshidratadas 6h/Control	Placas deshidratadas 8h/Control
1	48/41	28/36	37/39
2	35/31	27/23	27/28
3	37/33	34/33	32/29
4	30/28	41/36	22/16
5	18/24	24/23	23/22
6	10/7	6/9	25/29
7	28/27	25/20	26/28
8	84/79	71/63	58/62
9	69/65	62/77	59/54
10	76/72	61/73	73/75
Significación	$p=0,677$	$p=1,0$	$p=0,791$
Control negativo	0	0	0

Tabla 31. Unidades formadoras de colonias recuperadas tras cada periodo de deshidratación de las placas.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la recuperación de ufc entre las placas sometidas a periodos de deshidratación de hasta 8 horas y las placas no deshidratadas. No se observó crecimiento de ningún microorganismo en las placas sometidas exclusivamente a deshidratación en el interior de la cabina de flujo laminar, sin exposición posterior fuera del área clasificada.

Resultados

5.1.3. Capacidad neutralizante los agentes desinfectantes de las placas utilizadas para los controles de superficies

La capacidad neutralizante de las placas utilizadas para el muestreo de superficies depende de los agentes neutralizantes que contienen, así como del tipo y concentración de los desinfectantes utilizados.

En este caso, el objetivo fue comprobar el efecto de los residuos de los agentes desinfectantes utilizados en los procesos de limpieza sobre la capacidad de promoción de crecimiento de las placas Count-Tact™ 3P y la capacidad neutralizante de las mismas.

Ufc sembradas	Control	Biocida AH	Biocida PH	Biocida AQ	Etanol 70%	Isopropanol 70%
<i>Staphylococcus aureus</i> 28-33 ufc; DS:3 ufc	29	28	26	26	27	27
<i>Bacillus subtilis</i> 28-33 ufc; DS: 3 ufc	28	27	28	28	28	27
<i>Aspergillus niger</i> 28-33 ufc; DS:4-5 ufc	29	28	27	28	27	28
<i>Candida albicans</i> 28-33 ufc; DS:3 ufc	27	26	29	27	26	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 28-33 ufc; DS: 3 ufc	27	27	26	27	25	26
<i>Kocuria rhizophila</i> 38-40 ufc; DS:3 ufc	42	40	38	40	41	41
<i>Micrococcus luteus</i>	51	47	45	49	49	50
Significación	-	$p=0,398$	$p=0,438$	$p=0,398$	$p=0,244$	$p=0,243$

Tabla 32. Efecto de los desinfectantes sobre la promoción de crecimiento de los diferentes microorganismos en las placas CT3P.

En todos los casos, se recuperó un número de ufc que se encontraba entre la media ± 1 DS de las ufc sembradas, lo que demostraba que la composición de las placas de contacto era capaz de neutralizar la acción desinfectante de los residuos de los biocidas utilizados y, por tanto, las hacía aptas para su utilización en la monitorización de la biocontaminación de nuestra unidad. No se observaron diferencias significativas en la promoción de crecimiento entre las placas que estuvieron en contacto con los desinfectantes y la placa control.

5.1.4. Evolución de las técnicas y condiciones de cultivo microbiológico en la Unidad de Producción Celular del HRU de Málaga

Como se definió en el correspondiente epígrafe de Material y Métodos, los medios y condiciones de cultivo utilizados fueron progresivamente adaptados al proceso productivo, la instalación y, especialmente al conocimiento en base a la experiencia adquirida a partir de los resultados obtenidos hasta el momento. Siempre se tuvo el objetivo final de permitir, en la medida de lo posible, una eficaz y rápida lectura de las muestras, obteniendo resultados interpretables con el fin de poder implantar las medidas correctoras oportunas en el menor tiempo posible.

Resultados

Cada cambio de medio y condiciones de incubación fueron validadas previamente a su inclusión en el Plan de Control de la Biocontaminación. El proceso seguido fue:

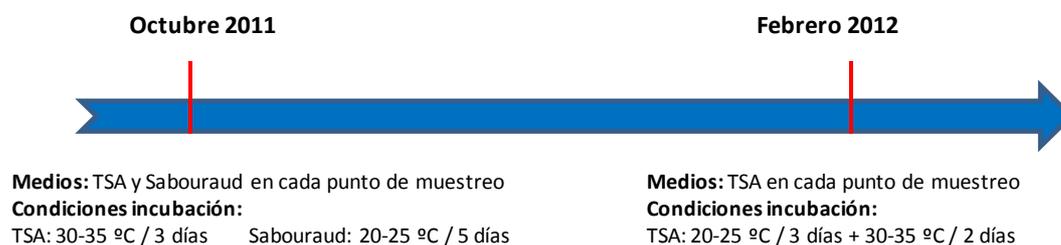


Figura 24: Modificación de las condiciones de cultivo a lo largo del tiempo.

Para comprobar si el cambio de placas y las nuevas condiciones de cultivo eran tan efectivos como las utilizadas hasta ese momento, se inocularon aproximadamente 25 ufc de cada microorganismo en placas de TSA3 por triplicado y se incubaron durante 3 días a 20-25 °C y posteriormente 2 días a 30-35 °C. Como control negativo se utilizó fluido de rehidratación (tabla 33).

Microorganismos	Ufc recuperadas tras 3 días a 20-25 °C			Ufc recuperadas tras 2 días más a 30-35 °C			p
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3	
<i>S. aureus</i>	20	22	24	21	22	24	0,822
<i>P. aeruginosa</i>	18	16	17	*			-
<i>B. subtilis</i>	19	22	20	19	22	21	0,822
<i>C. albicans</i>	20	19	21	20	19	21	1,0
<i>A. brasiliensis</i>	17	18	18	17	19	18	0,637
Control negativo	0	0	0	0	0	0	-

Tabla 33. Unidades formadoras de colonias recuperadas tras las dos incubaciones. *Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ocupan la mayor parte de la superficie de la placa, solapándose unas con otras y haciendo muy inexacto su recuento.

En todas las placas se obtuvieron recuperaciones acordes con lo establecido en la Farmacopea Europea 2.6.12 [105]: “las recuperaciones en medios sólidos no pueden diferir en más de un factor de 2 de los valores del inóculo”. Los criterios de aceptación al inocular aproximadamente 25 ufc se establecieron en 25 ± 12 ufc).

Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en el número de unidades formadoras de colonias recuperadas tras 3 días de incubación a 20-25°C y tras dos días adicionales a 30-35°C.

Posteriormente, con el fin de comprobar que el crecimiento conjunto de las bacterias y hongos seleccionados no se veía inhibido, se inocularon mezclas en la misma placa (inóculo de 25 μ l, aproximadamente 12 ufc de cada cepa) y se realizaron recuentos tras ambas condiciones de cultivo (figuras 25 a 27). El rango de aceptación establecido fue de 12 ± 6 ufc (tabla 34).

Resultados

Microorganismos		Ufc recuperadas tras 3 días/ 20-25 °C			Ufc recuperadas tras 2 días adicionales a 30-35 °C		
		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
<i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	14	13	14	14	13	14
	<i>C. albicans</i>	9	10	10	9	10	10
<i>S. aureus</i> + <i>A. brasiliensis</i>	<i>S. aureus</i>	6	7	9	6	7	9
	<i>A. brasiliensis</i>	6	6	7	6	6	7
<i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	7	6	6	*		
	<i>C. albicans</i>	9	11	10	9	11	10
<i>P. aeruginosa</i> + <i>A. brasiliensis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	7	8	7	*		
	<i>A. brasiliensis</i>	7	7	6	7	7	6
<i>B. subtilis</i> + <i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i>	10	11	10	10	11	10
	<i>C. albicans</i>	10	8	10	10	8	10
<i>B. subtilis</i> + <i>A. brasiliensis</i>	<i>B. subtilis</i>	9	10	9	9	10	9
	<i>A. brasiliensis</i>	7	8	6	7	8	6

Tabla 34. Unidades formadoras de colonias recuperadas tras la siembra de una combinación de hongos y bacterias y la incubación de las placas a las dos temperaturas.

Todos los recuentos se encontraron dentro de los niveles de aceptación, no observándose interferencia de crecimiento entre hongos y bacterias a los tiempos y temperaturas de incubación seleccionados.

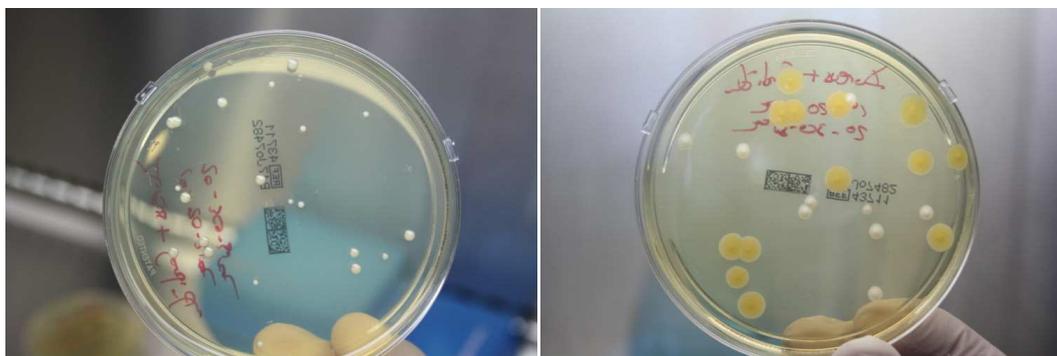


Figura 25. Incubación de un inóculo con una mezcla de *S. aureus* y *C. albicans*. Izquierda: tras 3 días a 20-25 °C. Derecha: misma placa con incubación adicional de 2 días a 30-35 °C.



Figura 26. Incubación de un inóculo con una mezcla de *S. aureus* y *Aspergillus*. Izquierda: tras 3 días a 20-25 °C. Derecha: misma placa con incubación adicional de 2 días a 30-35 °C.

Resultados



Figura 27. Detalle del crecimiento conjunto de *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Tras estos resultados se concluyó que tanto bacterias como levaduras y hongos filamentosos son capaces de crecer en medio TSA; no existieron variaciones significativas en cuanto al número de ufc obtenidas entre la primera y segunda incubación. En algunos casos, el sobrecrecimiento de las colonias tras la segunda incubación dificultaba su recuento (*Aspergillus* y *Bacillus*) y en ocasiones lo hacía prácticamente inviable (*Pseudomonas*).

A pesar de ello, no se consideró apropiado suprimir la segunda incubación (30-35 °C durante 2 días adicionales) ya que no se disponían de datos acerca de bacterias y hongos procedentes de los muestreos ambientales reales hasta el momento.

5.1.5. Validación del ensayo de esterilidad según Ph. Eur. 2.6.27 mediante el sistema BACTEC FX40

A. Etapa 1. Ensayos de promoción de crecimiento para confirmar la idoneidad de los frascos seleccionados (tabla 35)

<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 10788 (ATCC 6538). Inóculo: aprox. 50 ufc en solución salina estéril.			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Resultado e identificación si procede
01	Plus Aerobic/F	+ (01 d 21 h 00 min)	POSITIVO <i>Staphylococcus aureus</i>
	Lytic Anaerobic/F	+ (01 d 00 h 10 min)	
	Peds Plus/F	+ (00 d 15 h 39 min)	
02	Plus Aerobic/F	+ (01 d 08 h 29 min)	POSITIVO <i>Staphylococcus aureus</i>
	Lytic Anaerobic/F	+ (01 d 00 h 09 min)	
	Peds Plus/F	+ (00 d 15 h 19 min)	
<i>Candida albicans</i> NCPF 3179 (ATCC 10231). Inóculo: aprox. 50 ufc en solución salina estéril.			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Resultado e identificación si procede
03	Plus Aerobic/F	+ (04 d 11 h 38 min)	POSITIVO <i>Candida albicans</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	+ (02 d 22 h 36 min)	
04	Plus Aerobic/F	+ (02 d 13 h 16 min)	POSITIVO

Resultados

	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	+ (02 d 08 h 08 min)	
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 (ATCC6633). Inóculo: aprox. 50 ufc en solución salina estéril.			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Resultado e identificación si procede
05	Plus Aerobic/F	+ (00 d 12 h 24 min)	POSITIVO <i>Bacillus subtilis</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	+ (00 d 12 h 53 min)	
06	Plus Aerobic/F	+ (00 d 12 h 29 min)	POSITIVO <i>Bacillus subtilis</i>
	Lytic Anaerobic/F	+ (04 d 22 h 40 min)	
	Peds Plus/F	+ (00 d 12 h 48 min)	
<i>Aspergillus niger</i> NCPF 2275 (ATCC 16404). Inóculo: aprox. 50 ufc en solución salina estéril.			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Resultado e identificación si procede
07	Plus Aerobic/F	+ (01 d 22 h 19 min)	POSITIVO <i>Aspergillus niger</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	+ (03 d 13 h 30 min)	
08	Plus Aerobic/F	+ (02 d 13 h 09 min)	POSITIVO <i>Aspergillus niger</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	+ (02 d 17 h 08 min)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12924. Inóculo: aprox. 50 ufc en solución salina estéril.			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Resultado e identificación si procede
09	Plus Aerobic/F	+ (00 d 16 h 57 min)	POSITIVO <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	+ (00 d 16 h 37 min)	
10	Plus Aerobic/F	+ (00 d 17 h 16 min)	POSITIVO <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	+ (00 d 15 h 36 min)	
<i>Clostridium sporogenes</i> NCTC 12935 (ATCC 11437). Inóculo: aprox. 50 ufc en solución salina estéril.			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Resultado e identificación si procede
11	Plus Aerobic/F	>7 días*	POSITIVO <i>Clostridium sporogenes</i>
	Lytic Anaerobic/F	+ (00 d 14 h 53 min)	
	Peds Plus/F	>7 días*	
12	Plus Aerobic/F	>7 días*	POSITIVO <i>Clostridium sporogenes</i>
	Lytic Anaerobic/F	+ (00 d 14 h 43 min)	
	Peds Plus/F	>7 días*	
<i>Control Negativo (Suero fisiológico estéril)</i>			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Resultado e identificación si procede
13	Plus Aerobic/F	>7 días*	NEGATIVO
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	
	Peds Plus/F	>7 días*	

Tabla 35. Resultados ensayo promoción del crecimiento. Idoneidad de los frascos Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y Lytic Anaerobic/F. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación. No se detecta crecimiento en medios sólidos tras pase ciego.

Resultados

En las muestras inoculadas con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Clostridium sporogenes* se obtuvo crecimiento antes de finalizar el periodo de incubación (7 días a 35 °C), mientras que el control negativo inoculado no mostró crecimiento tras 7 días de incubación.

Los medios seleccionados, en las condiciones de cultivo establecidas fueron capaces de favorecer el crecimiento de los microorganismos establecidos en la *Ph. Eur.* 2.6.27.

El patrón de crecimiento de los microorganismos utilizados coincidió con el metabolismo de los mismos; los microorganismos anaerobios facultativos (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) crecieron tanto en los frascos de atmósfera aerobia como anaerobia; los microorganismos con metabolismo aerobio estricto (*Pseudomonas aeruginosa*), hongos (*Aspergillus niger*) y levaduras (*Candida albicans*) crecieron tan sólo en los frascos aerobios y el germen con metabolismo anaerobio estricto (*Clostridium sporogenes*) únicamente creció en frascos anaeróbicos.

B. Etapa 2. Validación del método de esterilidad con una matriz real.

Se analizó si la suspensión de células troncales mesenquimales utilizada como matriz del inóculo interfería con el ensayo dando lugar a falsos negativos (inhibición del crecimiento de microorganismos por la muestra a ensayar) o falsos positivos (interferencias de la muestra con el método de lectura del equipo Bactec FX40).

Análisis de la Sensibilidad y Especificidad del ensayo (tabla 36)

<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 10788 (ATCC 6538)			
Ufc: aprox. 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
14	Plus Aerobic/F	+ (01 d 04 h 48 min)	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Lytic Anaerobic/F	+ (01 d 00 h 38 min)	
	Peds Plus/F	+ (00 d 17 h 16 min)	
Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
15	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F		
	Peds Plus/F	+ (01 d 06 h 27 min)	<i>Staphylococcus aureus</i>
16	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F		
	Peds Plus/F		
<i>Candida albicans</i> NCPF 3179 (ATCC 10231)			
Ufc: aprox.15 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
17	Plus Aerobic/F	+ (07 d 12 h 34 min)**	<i>Candida albicans</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (06 d 22 h 03 min)	<i>Candida albicans</i>

Resultados

Ufc: aprox. 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
18	Plus Aerobic/F	+ (03 d 14 h 13 min)	<i>Candida albicans</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (05 d 21 h 11 min)	<i>Candida albicans</i>
Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
19	Plus Aerobic/F	+ (06 d 06 h 40 min)	<i>Candida albicans</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (09 d 00 h 01 min)**	<i>Candida albicans</i>
20	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F		
	Peds Plus/F		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12924			
Ufc: aprox. 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
21	Plus Aerobic/F	+ (00 d 16 h 26 min)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (00 d 16 h 27 min)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
22	Plus Aerobic/F	+ (00 d 17 h 08 min)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (00 d 16 h 36 min)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
23	Plus Aerobic/F	+ (00 d 17 h 27 min)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (00 d 16 h 28 min)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Kocuria rhizophila</i> NCTC 8340			
Ufc: aprox. 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
24	Plus Aerobic/F	+ (01 d 16 h 08 min)	<i>Kocuria rhizophila</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (01 d 13 h 08 min)	<i>Kocuria rhizophila</i>
Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
25	Plus Aerobic/F	+ (01 d 20 h 27 min)	<i>Kocuria rhizophila</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (01 d 15 h 07 min)	<i>Kocuria rhizophila</i>
26	Plus Aerobic/F	+ (01 d 20 h 57 min)	<i>Kocuria rhizophila</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (01 d 17 h 07 min)	<i>Kocuria rhizophila</i>

Resultados

<i>Propionibacterium acnes</i> DSM 1897			
Ufc: <i>aprox.</i> 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
27	Plus Aerobic/F	>7 días	No procede
	Lytic Anaerobic/F	+ (03 d 09 h 04 min)	<i>Propionibacterium acnes</i>
	Peds Plus/F	>7 días	No procede
Ufc: <i>aprox.</i> 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
28	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F	+ (03 d 13 h 34 min)	<i>Propionibacterium acnes</i>
	Peds Plus/F	>7 días*	No procede
29	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F	+ (03 d 11 h 34 min)	<i>Propionibacterium acnes</i>
	Peds Plus/F	>7 días*	No procede
<i>Aspergillus niger</i> NCPF 2275 (ATCC 16404)			
Ufc: <i>aprox.</i> 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
30	Plus Aerobic/F	+ (01 d 20 h 18 min)	<i>Aspergillus niger</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (02 d 02 h 37 min)	<i>Aspergillus niger</i>
Ufc: <i>aprox.</i> 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
31	Plus Aerobic/F	+ (02 d 02 h 58 min)	<i>Aspergillus niger</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (02 d 04 h 48 min)	<i>Aspergillus niger</i>
32	Plus Aerobic/F	+ (02 d 02 h 28 min)	<i>Aspergillus niger</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (02 d 07 h 08 min)	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 (ATCC6633)			
Ufc: <i>aprox.</i> 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
33	Plus Aerobic/F	+ (00 d 12 h 39 min)	<i>Bacillus subtilis</i>
	Lytic Anaerobic/F	+ (01 d 00 h 08 min)	
	Peds Plus/F	+ (00 d 12 h 08 min)	
Ufc: <i>aprox.</i> 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
34	Plus Aerobic/F	+ (00 d 11 h 43 min)	<i>Bacillus subtilis</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (00 d 12 h 23 min)	<i>Bacillus subtilis</i>
35	Plus Aerobic/F	+ (00 d 12 h 04 min)	<i>Bacillus subtilis</i>
	Lytic Anaerobic/F	>7 días*	No procede
	Peds Plus/F	+ (00 d 13 h 04 min)	<i>Bacillus subtilis</i>

Resultados

<i>Clostridium sporogenes</i> NCTC 12935 (ATCC 11437)			
Ufc: aprox. 10 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
36	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F	+ (00 d 14 h 35 min)	<i>Clostridium sporogenes</i>
	Peds Plus/F	>7 días*	No procede
Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Identificación
37	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F	+ (00 d 15 h 25 min)	<i>Clostridium sporogenes</i>
	Peds Plus/F	>7 días*	No procede
38	Plus Aerobic/F	>7 días*	No procede
	Lytic Anaerobic/F	+ (00 d 15 h 16 min)	<i>Clostridium sporogenes</i>
	Peds Plus/F	>7 días*	No procede

Tabla 36. Resultados análisis sensibilidad y especificidad del ensayo mediante el Sistema Bactec FX. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación. No se detecta crecimiento en medios sólidos tras pase ciego. **En dos de las muestras inoculadas (17 y 19) se observó crecimiento una vez transcurridos los 7 días de incubación.

Las condiciones de incubación en las dos atmósferas simultáneas propias del Sistema Bactec FX, una aeróbica (frascos Plus Aerobic/F y Peds Plus/F) y otra anaeróbica (frascos Lytic Anaerobic/F), son adecuadas para la detección de microorganismos aerobios, anaerobios y hongos. En todos los casos, la identificación realizada mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF FS fue acorde con la cepa inoculada.

Todos los inóculos de 10 ufc mostraron resultados positivos. De los dos ensayos realizados con 5 ufc, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* mostraron crecimiento en tan sólo uno de ellos. Esto, probablemente sea debido a la dificultad para realizar suspensiones homogéneas con un número tan reducido de microorganismos.

En la fase de validación del método, se inocularon un total de 40 muestras utilizando los **3 tipos de frascos**, los resultados se muestran en la tabla 37 y 38.

	Muestras inoculadas con 10 ufc	Fracos inoculados con excipiente
Positivos	8 (VP)	0 (FP)
Negativos	0 (FN)	8 (VN)
	Muestras inoculadas con 5 ufc	Fracos inoculados con excipiente
Positivos	14 (VP)	0 (FP)
Negativos	2 (FN)	8 (VN)

Tabla 37. Resultados fase de validación. VP = verdaderos positivos; VN= verdaderos negativos; FP = falsos positivos; FN =falsos negativos.

La sensibilidad del ensayo resultó del 100 % con 10 ufc y del 87,5 % con 5 ufc (la mínima ensayada, tabla 38).

Resultados

	Inóculos de 10 ufc	Inóculos de 5 ufc
Sensibilidad	100 %	87,5 %
Especificidad	100 %	100 %
VPP	100 %	100 %
VPN	100 %	80 %

Tabla 38. Resultados comparativos entre inóculos de 10 ufc y 5 ufc.

Consideraciones acerca de las limitaciones del ensayo

La preparación de las muestras para su inoculación se ha realizado a partir de cepas comerciales diluidas en suero fisiológico estéril para realizar la promoción de crecimiento (primera parte de la validación) y en suspensiones de CMMTAd para la validación del método (segunda parte de la validación).

Durante la validación del método se han utilizado concentraciones microbianas extremadamente pequeñas (5 y 10 ufc). La preparación de las muestras con 5 ufc se realizó por dilución del preparado comercial de 30 ufc (en 3 ml de suspensión celular). Posteriormente, y tras homogeneizar por agitación la muestra, se procedió a inocular 0,5 ml de suspensión en cada uno de los frascos utilizados. La homogeneización de la muestra por agitación (Vortex) de cantidades tan pequeñas de microorganismos puede conducir a errores en la concentración estimada de cada inóculo y por ello puede hacer que inóculos previstos de 5 ufc finalmente posean una concentración inferior y conducir a falsos negativos o a períodos de detección mayores.

Aún así, el número de alícuotas preparadas (2 muestras) con 5 ufc es muy pequeño para determinar si los falsos negativos obtenidos a esta concentración se deben a la dificultad de obtener suspensiones homogéneas o a la sensibilidad del ensayo. Con el análisis de reproducibilidad del ensayo realizado a continuación se pueden obtener conclusiones con un número de muestras mayor.

5.1.5.a. Análisis de la reproducibilidad del ensayo. Estudio comparativo entre frascos Peds Plus/F y Plus Aerobic/F

Para determinar la reproducibilidad del ensayo y conocer la robustez de la técnica se analizaron 10 réplicas de cada microorganismo por método tradicional y por el sistema Bactec FX:

▲ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 (ATCC 6538) (tablas 39 a 41).

Método: Bactec FX40

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
47	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F	00 d 15 h 44 min	Cocos Gram positivos

Resultados

48	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F	00 d 17 h 04 min	Cocos Gram positivos
49	Plus Aerobic/F	04 d 03 h 35 min	Cocos Gram positivos
	Peds Plus/F	00 d 16 h 04 min	
50	Plus Aerobic/F	02 d 15 h 43 min	
	Peds Plus/F	00 d 16 h 03 min	
51	Plus Aerobic/F	02 d 07 h 33 min	
	Peds Plus/F	00 d 15 h 53 min	
52	Plus Aerobic/F	02 d 16 h 13 min	
	Peds Plus/F	00 d 15 h 13 min	
53	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F	00 d 15 h 53 min	Cocos Gram positivos
54	Plus Aerobic/F	01 d 18 h 37 min	
	Peds Plus/F	00 d 15 h 07 min	
55	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F	00 d 15 h 07 min	Cocos Gram positivos
56	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F	00 d 14 h 37 min	Cocos Gram positivos
<i>Control negativo: 0 Ufc</i>		Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml	
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
57	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F		

Tabla 39. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Ph. Eur. 2.6.27 con *S.aureus*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación

Método: Lectura turbidez en medio TSB

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aprox. de lectura (horas)	Tinción de Gram
47.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 24h	Cocos Gram positivos
48.bis		Positivo a las 24h	
49.bis		Positivo a las 72h	
50.bis		Positivo a las 48h	
51.bis		Positivo a las 48h	
52.bis		Positivo a las 48h	
53.bis	<i>No se observa turbidez</i>	>7 días	No procede
54.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 72h	Cocos Gram positivos
55.bis		Positivo a las 72h	
56.bis		Positivo a las 72h	
<i>Control negativo</i>			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aproximado de lectura (horas)	Tinción de Gram
57.bis	No se observa turbidez	> 7 días	No se observan microorganismos

Tabla 40. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con *S.aureus*

Resultados

De las 10 muestras inoculadas, sólo 5 mostraron resultados positivos en los frascos Plus Aerobic/F frente a los 10 positivos de los frascos Peds Plus/F. Una de las alícuotas inoculadas en los tubos de TSB resultó negativa. El VPN y la sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F y Peds Plus/F comparadas con el método tradicional (TSB) se muestran en la tabla 41.

	TSB caldo	Plus Aerobic/F	Peds Plus/F
VPN (%)	50	16,6	100
Sensibilidad (%)	90	50	100

Tabla 41. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.

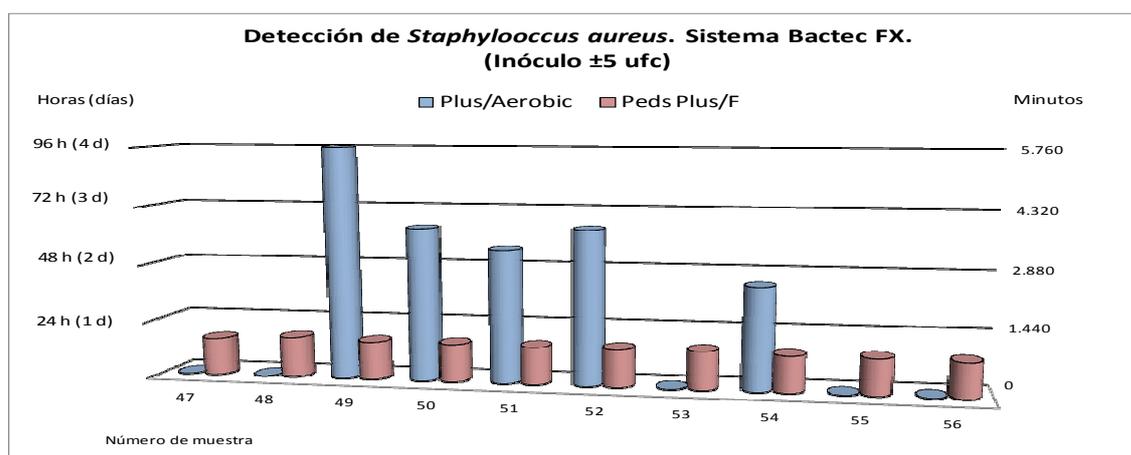


Figura 28. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de *S. aureus* en sistema Bactec FX.

Para aquellos resultados positivos, el promedio de tiempo de detección fue de 65,13 horas en el caso de los frascos Plus Aerobic/F frente a las 15,75 horas de los frascos Peds Plus/F (figura 28).

Nota aclaratoria: aunque las condiciones óptimas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* se producen en atmósferas anaerobias, la presente comparativa se ha realizado tan sólo en los frascos aerobios con el fin de detectar las diferencias entre ambos.

▲ *Clostridium sporogenes* NCTC 12935 (tablas 42 a 44).

Método: Bactec FX40

Ufc: aprox. 5		Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml	
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
58	Lytic Anaerobic/F	00 d 15 h 38 min	Bacilos Gram positivos
59		00 d 15 h 18 min	
60		00 d 15 h 18 min	
61		00 d 15 h 28 min	
62		00 d 16 h 08 min	
63		00 d 15 h 58 min	
64		00 d 15 h 28 min	
65		00 d 15 h 18 min	

Resultados

66		00 d 16 h 07 min	
67		00 d 16 h 07 min	
<i>Control negativo</i>			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
68	Lytic Anaerobic/F	> 7 días	No se observan microorganismos

Tabla 42. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con *C.sporogenes*.

Método: Lectura turbidez en medio Tioglicolato (THIO)

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aprox. de lectura (horas)	Tinción de Gram
58.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 48h	Bacilos Gram positivos
59.bis			
60.bis			
61.bis			
62.bis			
63.bis			
64.bis			
65.bis			
66.bis			
67.bis			
<i>Control negativo</i>			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aproximado de lectura (horas)	Tinción de Gram
68.bis	No se observa turbidez	> 7 días	No se observan microorganismos

Tabla 43. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo THIO con *C.sporogenes*.

Todas las muestras inoculadas mostraron resultados positivos en los frascos Lytic Anaerobic/F y tubos de tioglicolato. El VPN y la sensibilidad del medio Lytic Anaerobic/F comparadas con el método tradicional (tioglicolato) se muestran en la tabla 44.

	THIO caldo	Lytic Anaerobic/F
VPN (%)	100	100
Sensibilidad (%)	100	100

Tabla 44. VPN y Sensibilidad del medio Lytic Anaerobic/F y THIO

Resultados

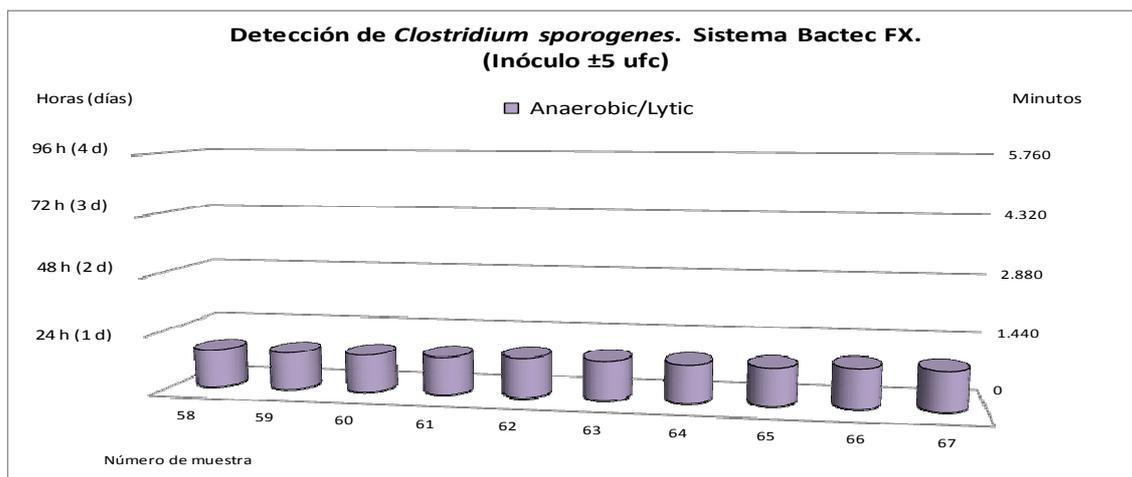


Figura 29. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de *Clostridium sporogenes* en sistema Bactec FX.

El promedio de tiempo de detección fue de 15,6 horas (figura 29).

▲ *Bacillus subtilis* NCTC 10400 (tablas 45 a 47).

Método: Bactec FX40

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml				
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram	
69	Plus Aerobic/F	00 d 11 h 46 min	Bacilos Gram positivos	
	Peds Plus/F	00 d 11 h 26 min		
70	Plus Aerobic/F	00 d 12 h 26 min		
	Peds Plus/F	00 d 11 h 26 min		
71	Plus Aerobic/F	00 d 11 h 56 min		
	Peds Plus/F	00 d 11 h 26 min		
72	Plus Aerobic/F	00 d 13 h 16 min		
	Peds Plus/F	00 d 11 h 46 min		
73	Plus Aerobic/F	No se detecta*		No se observan microorganismos
	Peds Plus/F	00 d 11 h 16 min		Bacilos Gram positivos
74	Plus Aerobic/F	00 d 12 h 24 min		
	Peds Plus/F	00 d 11 h 54 min		
75	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos	
	Peds Plus/F	00 d 11 h 33 min	Bacilos Gram positivos	
76	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No procede	
	Peds Plus/F	00 d 11 h 43 min	Bacilos Gram positivos	
77	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos	
	Peds Plus/F	00 d 11 h 03 min	Bacilos Gram positivos	
78	Plus Aerobic/F	00 d 12 h 13 min		
	Peds Plus/F	00 d 11 h 23 min		
<i>Control negativo</i>				
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml				
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram	

Resultados

79	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F		

Tabla 45. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con *B.subtilis*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

Método: Lectura turbidez en medio TSB.

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aprox. de lectura (horas)	Tinción de Gram
69.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 24h	Bacilos Gram positivos
70.bis	No se observa turbidez	No se detecta*	No se observan microorganismos
71.bis			
72.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 24h	Bacilos Gram positivos
73.bis			
74.bis			
75.bis	No se observa turbidez	No se detecta*	No se observan microorganismos
76.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 24h	Bacilos Gram positivos
77.bis	No se observa turbidez	No se detecta*	No se observan microorganismos
78.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 24h	Bacilos Gram positivos
Control negativo			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aproximado de lectura (horas)	Tinción de Gram
79.bis	No se observa turbidez	No se detecta*	No se observan microorganismos

Tabla 46. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con *B.subtilis*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

De las 10 muestras inoculadas, 6 mostraron resultados positivos en los frascos Plus Aerobic/F frente a los 10 positivos de los frascos Peds Plus/F. En los tubos de TSB, 4 de las alícuotas inoculadas resultaron negativas.

El VPN y la sensibilidad comparada de los frascos Plus Aerobic/F y Peds/Plus con el método tradicional (TSB) se muestran en la tabla 47.

	TSB caldo	Plus Aerobic/F	Peds Plus/F
VPN (%)	50	50	100
Sensibilidad (%)	60	60	100

Tabla 47. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.

Resultados

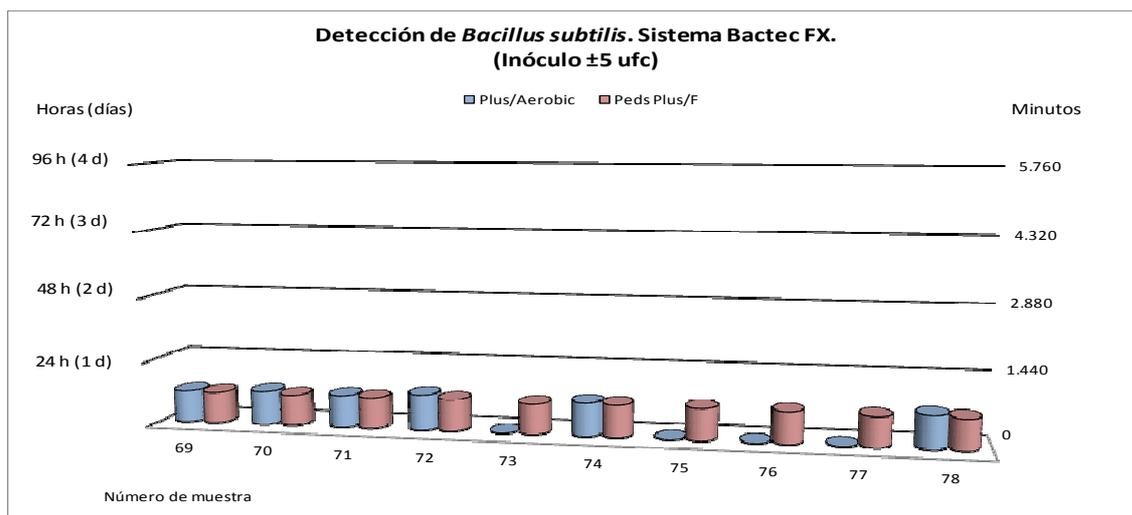


Figura 30. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de *Bacillus subtilis* en sistema Bactec FX.

Para aquellos resultados positivos, el promedio de tiempo de detección fue de 12,33 horas en el caso de los frascos Plus Aerobic/F frente a las 11,48 horas de los frascos Peds Plus/F (figura 30).

▲ *Candida albicans* NCPF 3179 (ATCC 10231) (tablas 48 a 50).

Método: Bactec FX40

Ufc: aprox. 5		Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml	
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
80	Plus Aerobic/F	02 d 15 h 07 min	Formas levaduriformes Gram positivas
	Peds Plus/F	06 d 10 h 32 min	
81	Plus Aerobic/F	04 d 16 h 59 min	
	Peds Plus/F	06 d 22 h 54 min	
82	Plus Aerobic/F	06 d 18 h 51 min	
	Peds Plus/F	06 d 03 h 11 min	
83	Plus Aerobic/F	02 d 18 h 56 min	
	Peds Plus/F	06 d 22 h 53 min	
84	Plus Aerobic/F	04 d 11 h 17 min	
	Peds Plus/F	05 d 23 h 39 min	
85	Plus Aerobic/F	07 d 00 h 10 min	
	Peds Plus/F	05 d 10 h 37 min	
86	Plus Aerobic/F	04 d 14 h 37 min	
	Peds Plus/F	06 d 23 h 11 min	
87	Plus Aerobic/F	02 d 15 h 13 min	
	Peds Plus/F	06 d 23 h 00 min	
88	Plus Aerobic/F	06 d 23 h 20 min	
	Peds Plus/F	05 d 05 h 56 min	
89	Plus Aerobic/F	02 d 19 h 03 min	
	Peds Plus/F	06 d 23 h 00 min	

Resultados

<i>Control negativo</i>			
Ufc: 0		Lote: No aplica	Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
90	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F		

Tabla 48. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con *C. albicans*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

Método: Lectura turbidez en medio TSB.

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aprox. de lectura (horas)	Tinción de Gram
80.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 48h	Formas levaduriformes Gram positivas
81.bis			
82.bis			
83.bis			
84.bis			
85.bis			
86.bis			
87.bis			
88.bis			
89.bis			
<i>Control negativo</i>			
Ufc: 0		Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml	
Muestra	Resultado	Tiempo aproximado de lectura (horas)	Tinción de Gram
90.bis	No se observa turbidez	No se detecta*	No se observan microorganismos

Tabla 49. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con *C. albicans*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

De las 10 muestras inoculadas, todas mostraron resultados positivos en los frascos Plus Aerobic/F y Peds Plus/F. En los tubos de TSB, las 10 alícuotas inoculadas resultaron positivas.

El VPN y la sensibilidad comparadas de los frascos Plus Aerobic/F y Peds Plus/F con el método tradicional (TSB) se muestran en la tabla 50.

	TSB caldo	Plus Aerobic/F	Peds Plus/F
VPN (%)	100	100	100
Sensibilidad (%)	100	100	100

Tabla 50. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.

Resultados

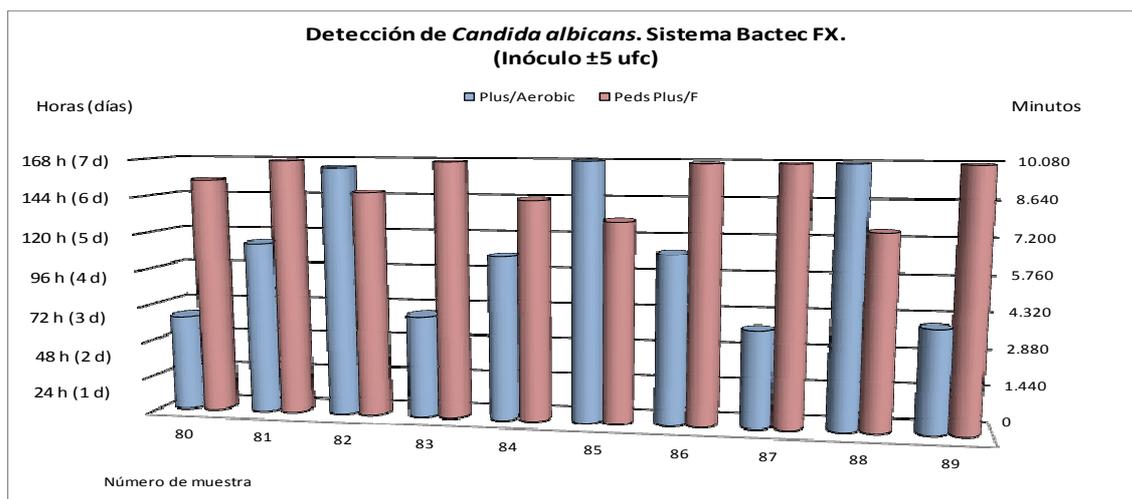


Figura 31. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de *Candida albicans* en sistema Bactec FX.

El promedio de tiempo de detección fue de 108,95 horas en el caso de los frascos Plus Aerobic/F frente a las 153,65 horas de los frascos Peds Plus/F (figura 31).

▲ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924 (tablas 51 a 53).

Método: Bactec Fx

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
91	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 01 min	Bacilos Gram negativos
	Peds Plus/F	0 d 17 h 41 min	
92	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 15 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 05 min	
93	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 15 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 05 min	
94	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 05 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 34 min	
95	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 04 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 34 min	
96	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 34 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 34 min	
97	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 44 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 04 min	
98	Plus Aerobic/F	0 d 18 h 44 min	
	Peds Plus/F	0 d 18 h 53 min	
99	Plus Aerobic/F	0 d 17 h 43 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 03 min	
100	Plus Aerobic/F	0 d 19 h 03 min	
	Peds Plus/F	0 d 17 h 23 min	

Resultados

Control negativo			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
101	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F		

Tabla 51. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con *P. aeruginosa*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

Método: Lectura turbidez en medio TSB

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aprox.de lectura (horas)	Tinción de Gram
91.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 24h	Bacilos Gram negativos
92.bis			
93.bis			
94.bis			
95.bis			
96.bis			
97.bis			
98.bis			
99.bis			
100.bis			
Control negativo			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1x10 ⁶ células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aproximado de lectura (horas)	Tinción de Gram
101.bis	No se observa turbidez	No se detecta*	No se observan microorganismos

Tabla 52. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con *P. aeruginosa*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

De las 10 muestras inoculadas, todas mostraron resultados positivos en los frascos Plus Aerobic/F y Peds Plus/F. En los tubos de TSB, las 10 alícuotas inoculadas resultaron positivas.

El VPN y la sensibilidad comparada de los medios Plus Aerobic/F y Peds Plus/F con el método tradicional (TSB) se muestran en la tabla 53.

	TSB caldo	Plus Aerobic/F	Peds Plus/F
VPN (%)	100	100	100
Sensibilidad (%)	100	100	100

Tabla 53. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.

Resultados

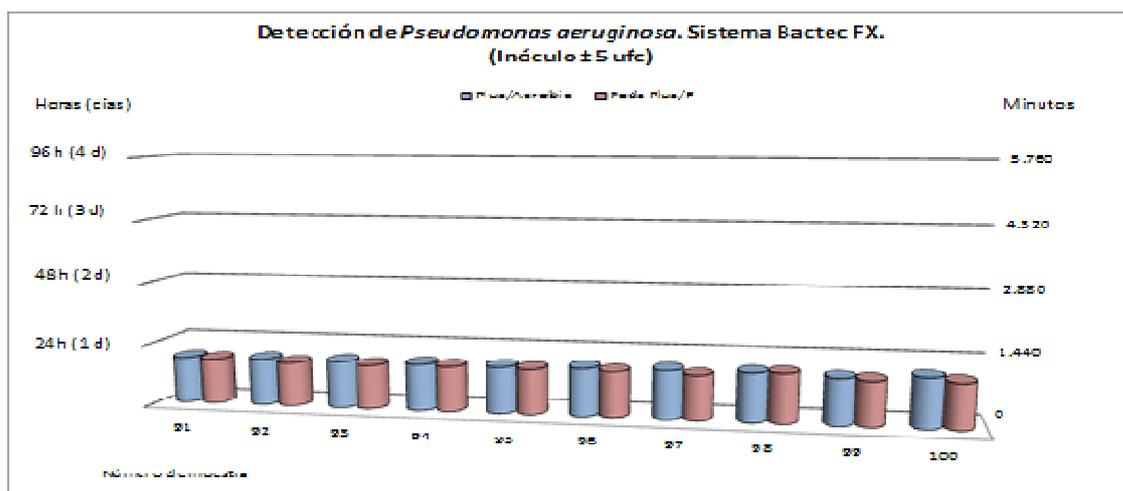


Figura 32. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de *Pseudomonas aeruginosa* en sistema Bactec FX.

El promedio de tiempo de detección fue de 18,33 horas en el caso de los frascos Plus Aerobic/F frente a las 17,48 horas de los frascos Peds Plus/F (figura 32).

▲ *Aspergillus niger* NCPF 2275 (tablas 54 a 56).

Método: Bactec Fx

Ufc: aprox. 5		Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml	
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
102	Plus Aerobic/F	01 d 22 h 05 min	Micelio macroscópico
	Peds Plus/F	02 d 02 h 45 min	
103	Plus Aerobic/F	01 d 23 h 35 min	
	Peds Plus/F	02 d 03 h 05 min	
104	Plus Aerobic/F	01 d 22 h 25 min	
	Peds Plus/F	02 d 05 h 34 min	
105	Plus Aerobic/F	01 d 20 h 14 min	
	Peds Plus/F	02 d 03 h 24 min	
106	Plus Aerobic/F	01 d 23 h 03 min	
	Peds Plus/F	02 d 04 h 53 min	
107	Plus Aerobic/F	02 d 02 h 33 min	
	Peds Plus/F	02 d 02 h 53 min	
108	Plus Aerobic/F	02 d 00 h 23 min	
	Peds Plus/F	02 d 06 h 33 min	
109	Plus Aerobic/F	01 d 22 h 49 min	
	Peds Plus/F	02 d 02 h 29 min	
110	Plus Aerobic/F	01 d 20 h 59 min	
	Peds Plus/F	02 d 02 h 59 min	
111	Plus Aerobic/F	02 d 02 h 28 min	
	Peds Plus/F	02 d 04 h 38 min	

Resultados

<i>Control negativo</i>			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Frasco	Crecimiento (días/horas/min)	Tinción de Gram
112	Plus Aerobic/F	No se detecta*	No se observan microorganismos
	Peds Plus/F		

Tabla 54. Análisis de la reproducibilidad del ensayo Eu. Ph. 2.6.27 con *A. niger*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

Método: Lectura turbidez en medio TSB

Ufc: aprox. 5 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aproximado de lectura (horas)	Tinción de Gram
102.bis	Se observa turbidez	Positivo a las 48 h	Micelio macroscópico
103.bis		Positivo a las 96 h	
104.bis		Positivo a las 96 h	
105.bis		Positivo a las 72 h	
106.bis		Positivo a las 48 h	
107.bis		Positivo a las 72 h	
108.bis		Positivo a las 96 h	
109.bis		Positivo a las 120 h	
110.bis		Positivo a las 96 h	
111.bis		Positivo a las 72 h	
<i>Control negativo</i>			
Ufc: 0 Diluyente: Suspensión celular 1×10^6 células/ml			
Muestra	Resultado	Tiempo aproximado de lectura (horas)	Tinción de Gram
112.bis	No se observa turbidez	No se detecta*	No se observan microorganismos

Tabla 55. Análisis de la reproducibilidad del ensayo en tubo TSB con *A. niger*. *No se detecta crecimiento tras 7 días de incubación.

De las 10 muestras inoculadas, todas mostraron resultados positivos en los frascos Plus Aerobic/F y Peds Plus/F. En los tubos de TSB, las 10 alícuotas inoculadas resultaron positivas.

El valor predictivo negativo (VPN) y la sensibilidad comparadas de los frascos Plus Aerobic/F y Peds Plus/F con el método tradicional (TSB) se muestran en la tabla 56.

	TSB caldo	Plus Aerobic/F	Peds Plus/F
VPN (%)	100	100	100
Sensibilidad (%)	100	100	100

Tabla 56. VPN y Sensibilidad de los medios Plus Aerobic/F, Peds Plus/F y TSB.

Resultados

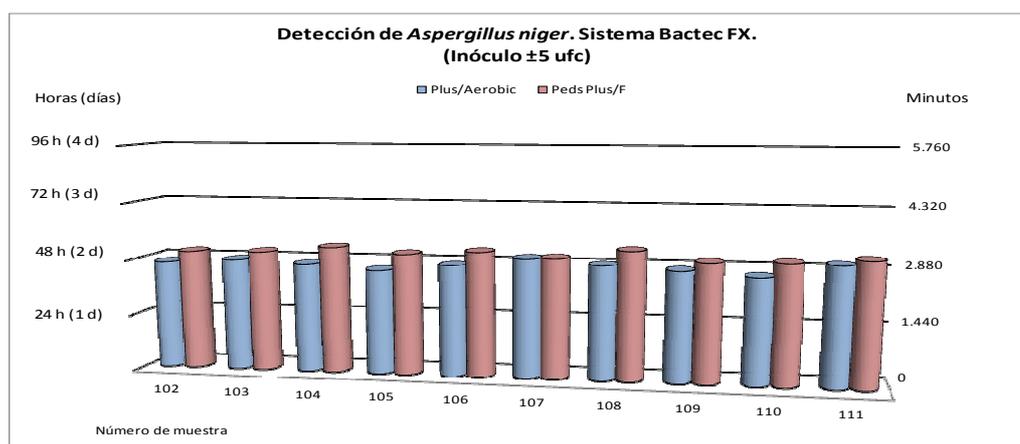


Figura 33. Tiempo de detección de crecimiento de los inóculos de *Aspergillus niger* en sistema Bactec FX.

El promedio de tiempo de detección fue de 47,25 horas en el caso de los frascos Plus Aerobic/F frente a las 51,91 horas de los frascos Peds Plus/F (figura 33).

En el caso de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aspergillus niger* no se observaron diferencias en cuanto a la sensibilidad y valor predictivo negativo (VPN) entre ambos métodos. Sin embargo, se observaron diferencias a favor del método tradicional en el caso del tiempo de detección de *Candida albicans* (24 horas frente a las aproximadamente 4 días de los frascos Plus Aerobic/F y 6 días de los Peds Plus/F).

En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, se apreciaron diferencias en la sensibilidad y valor predictivo negativo del ensayo (figura 34). En lo referente a la sensibilidad, el frasco Peds Plus/F mostró una sensibilidad superior a la del frasco Plus Aerobic/F y al ensayo tradicional:

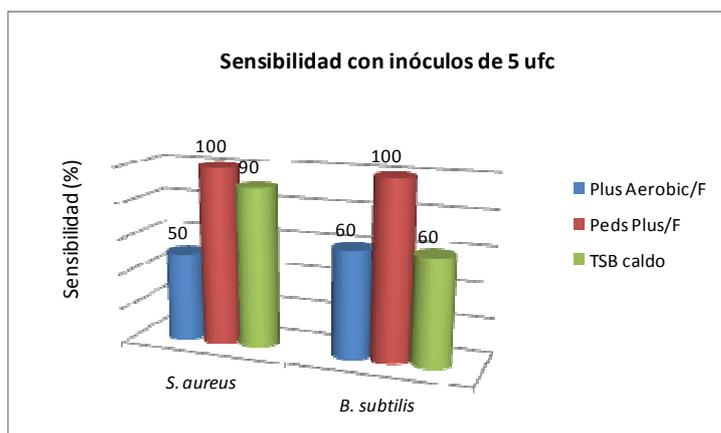


Figura 34. Sensibilidad para la detección de *S. aureus* y *B. subtilis* mediante sistema Bactec FX y medio TSB tradicional

El valor predictivo negativo también resulto ser superior mediante la detección de ambos gérmenes con el frasco Peds Plus/F (figura 35).

Resultados

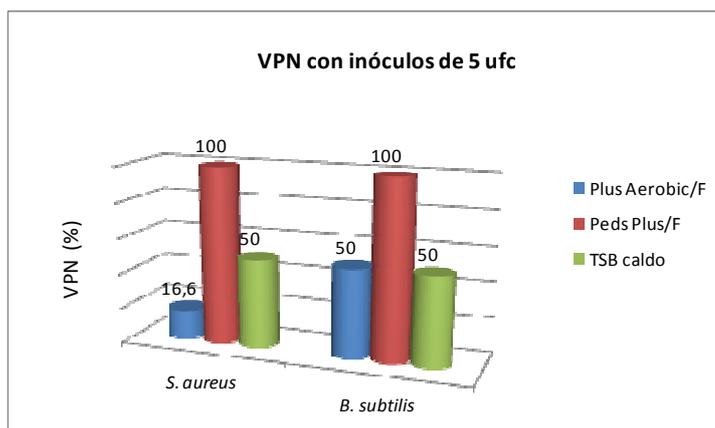


Figura 35. Valor predictivo Negativo para la detección de *S. aureus* y *B. subtilis* por ambos métodos

Aunque ambos frascos poseen resinas que neutralizan los antibióticos presentes en la muestra, se observa una mayor sensibilidad del ensayo y un mayor valor predictivo negativo con la utilización de los frascos Peds Plus/F que con los frascos Plus Aerobic/F.

Esto, unido al hecho de que los frascos Peds Plus/F requieren un volumen de muestra óptimo (1 a 3 ml) significativamente inferior al de los frascos Plus Aerobic/F (8 a 10 ml) hace que se considere más adecuada la utilización de la **combinación de frascos Peds Plus/F y Lytic Anaerobic/F** como medios de detección para bacterias aeróbicas y hongos el primero, y para la detección de bacterias anaerobias el segundo.

5.1.5.b. Promoción de crecimiento en medios utilizados para realizar el ensayo de esterilidad (Peds Plus /F y Lytic Anaerobic/F)

Aquí se muestran los resultados de la promoción de crecimiento (tabla 57), realizados de forma periódica, como parte de la aprobación de cada lote de frascos Peds Plus /F y Lytic Anaerobic/F recibidos en nuestra Unidad y usados en los ensayos de esterilidad. Desde el requerimiento por parte de la AEMPS se han recibido 3 lotes de cada tipo de frasco y por tanto, se han realizado 3 promociones de crecimiento en frascos Peds Plus /F y Lytic Anaerobic/F, con inóculos menores a los de la validación inicial.

Todos los microorganismos mostraron crecimiento en los frascos utilizados antes de finalizar el período de incubación de 7 días:

	<i>S.aureus</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>C. albicans</i>		<i>A. niger</i>		<i>C. perfringens</i>	
	Inóculo	Min	Inóculo	Min	Inóculo	Min	Inóculo	Min	Inóculo	Min	Inóculo	Min
Prom 1	15	908	15	936	15	709	15	3584	15	2993	15	880
Prom 2	15	905	15	903	15	667	15	8487	15	3097	30	874
Prom 3	30	863	30	904	30	704	30	5107	30	3514	15	969

Tabla 57. Tiempo por cada inóculo microbiológico en mostrar un resultado positivo en el sistema Bactec FX. Inóculo: ufc inoculadas en cada frasco. Min: minutos transcurridos desde que se introdujo el frasco en el sistema Bactec FX hasta que se detectó crecimiento.

5.2. OBJETIVO 2. DISEÑAR E IMPLANTAR LOS PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA NECESARIOS PARA PRESERVAR LAS CONDICIONES AMBIENTALES EXIGIDAS PARA LA FABRICACIÓN ASÉPTICA DE MEDICAMENTOS EN LA UPC.

5.2.1. Demostración de la capacidad germicida de los desinfectantes utilizados

Etapa 1: Ensayo de la capacidad desinfectante en tubo.

Se eligieron tiempos de contacto de los biocidas con los microorganismos de 5, 10 y 15 minutos, atendiendo a las especificaciones de los tiempos óptimos suministradas por los fabricantes para cada biocida (tabla 58).

Biocida	Bactericida	Fungicida	Esporicida	Tiempo de exposición ensayado
Biocida PH	5 min	15 min	15 min	
Biocida AH	5 min	15 min	> 20 min	5 min/ 10 min/ 15min
Biocida AQ	5 min	15 min	60 min	
Alcohol etílico o isopropílico al 70%	5 min	15 min	Sin actividad	

Tabla 58. Tiempos de contacto óptimo para ejercer actividad bactericida, fungicida y esporicida y tiempo de exposición ensayado para evaluar la actividad desinfectante en tubo.

Los resultados de las unidades formadoras de colonias recuperadas de cada microorganismo tras ser enfrentadas a cada una de las diluciones seriadas de cada uno de los biocidas, durante 5, 10 y 15 minutos, se presentan como Tablas en el Anexo XIII. En ellas se pueden observar las máximas diluciones de biocida a las que siguen conservando su capacidad bactericida, fungicida y esporicida, y los tiempos óptimos de contacto para ejercer estos efectos.

Resumiendo, en la tabla 59, se pueden observar las máximas diluciones de cada uno de los biocidas capaces de ejercer su actividad bactericida, fungicida o esporicida tras tiempos de contacto de 5, 10 y 15 minutos, con la reducción logarítmica del inóculo alcanzada.

Biocida	Microorganismo	Máxima dilución que supera criterios de aceptación (reducciones logarítmicas)*		
		5 min	10 min	15 min
Biocida PH	<i>S. aureus</i>	1/128 (>7,1)	≥ 1/256 (>7,1)	≥ 1/256 (>7,1)
	<i>M. luteus</i>	1/128 (>7,2)	≥ 1/256 (>7,2)	≥ 1/256 (>7,2)
	<i>E. coli</i>	1/128 (>7,0)	≥ 1/256 (>7,0)	≥ 1/256 (>7,0)
	<i>C. albicans</i>	1/128 (>6,5)	1/128 (>6,5)	1/128 (>6,5)
	<i>B. subtilis</i>	1/8 (>6,4)	1/16 (>6,4)	1/16 (>6,4)
	<i>A. niger</i>	1/1 (>4,0)	1/2 (>4,0)	1/4 (>4,0)
Biocida AH	<i>S. aureus</i>	1/1 (>7,1)	1/4 (>7,1)	1/16 (4,0)
	<i>M. luteus</i>	1/1 (>7,2)	1/1 (>7,2)	1/2 (>7,2)
	<i>E. coli</i>	1/1 (>6,9)	1/2 (>6,9)	1/4 (>6,9)
	<i>C. albicans</i>	1/1 (>6,5)	1/1 (>6,5)	1/2 (>6,5)
	<i>B. subtilis</i>	No superado	No superado	1/1 (>6,4)
	<i>A. niger</i>	No superado	1/1 (>4,0)	1/2 (>4,0)

Resultados

Biocida AQ	<i>S. aureus</i>	$\geq 1/256 (>7,1)$	$\geq 1/256 (>7,1)$	$\geq 1/256 (>7,1)$
	<i>M. luteus</i>	$\geq 1/256 (>7,2)$	$\geq 1/256 (>7,2)$	$\geq 1/256 (>7,2)$
	<i>E. coli</i>	$\geq 1/256 (>7,0)$	$\geq 1/256 (>7,0)$	$\geq 1/256 (>7,0)$
	<i>C. albicans</i>	$\geq 1/256 (>6,5)$	$\geq 1/256 (>6,5)$	$\geq 1/256 (>6,5)$
	<i>B. subtilis</i>	1/32 (>6,4)	1/64 (>6,4)	1/64 (>6,4)
	<i>A. niger</i>	1/4 (>4,0)	1/4 (>4,0)	1/4 (>4,0)
Etanol 70 %	<i>S. aureus</i>	1/1 (>7,1)	1/2 (>7,1)	1/4 (>7,1)
	<i>M. luteus</i>	1/2 (>7,2)	1/2 (>7,2)	1/2 (>7,2)
	<i>E. coli</i>	1/1 (>7,0)	1/2 (>7,0)	1/2 (>7,0)
	<i>C. albicans</i>	1/1 (>6,5)	1/1 (>6,5)	1/1 (>6,5)
Isopropanol 70%	<i>S. aureus</i>	1/4 (>7,1)	1/4 (>7,1)	1/4 (>7,1)
	<i>M. luteus</i>	1/2 (>7,2)	1/2 (>7,2)	1/2 (>7,2)
	<i>E. coli</i>	1/2 (>7,0)	1/2 (>7,0)	1/2 (>7,0)
	<i>C. albicans</i>	1/2 (>6,5)	1/2 (>6,5)	1/2 (>6,5)

Tabla 59. Dilución máxima de cada biocida que supera los criterios de aceptación *[(> 5 reducciones logarítmicas para efecto bactericida (*S. aureus*, *M. luteus* y *E. coli*); > 4 reducciones logarítmicas para poseer efecto fungicida (*C. albicans*) y esporicida (*B. subtilis* y *A. niger*)].

Como se puede observar, de los biocidas con actividad esporicida (PH, AH y AQ), el Biocida AQ presentó la mayor capacidad bactericida (diluido hasta 1/256, con tan sólo 5 minutos de contacto), seguido del biocida PH (diluido hasta 1/128 a los 5 y 10 minutos, y con diluciones de hasta 1/256 al prolongar el tiempo de contacto a 15 minutos). El biocida AH fue el menos efectivo frente a bacterias al final del periodo de ensayo (15 minutos) presentando diluciones eficaces máximas de 1/16 para *S.aureus*, 1/2 para *M. luteus*, y 1/4 para *E. coli*.

En cuanto a la actividad fungicida medida frente a *C. albicans*, el biocida AH resultó de nuevo menos eficaz con una dilución máxima eficaz de 1/2 tras 15 minutos de contacto, frente a la 1/128 del biocida PH y 1/256 del biocida AQ, tras sólo 5 minutos de contacto.

En lo relativo a la actividad esporicida tras 15 minutos de contacto, verificada mediante el uso de esporas de *B. subtilis* y *A. niger*, de nuevo el biocida AH presentó menor actividad (diluciones máximas de 1/1 y 1/2, respectivamente,) que los biocidas PH (1/16 y 1/4) y AQ (1/64 y 1/4).

El alcohol isopropílico al 70% mostró una eficacia ligeramente superior al alcohol etílico 70%. Ambos fueron capaces de ejercer su actividad bactericida con diluciones 1/2 o 1/4, y la actividad fungicida sin diluir en el caso del etanol y diluido 1/2 con el isopropanol.

Etapa 2: Prueba de desinfección en superficies de contacto.

En esta etapa se evaluó la capacidad bactericida, fungicida y esporicida de los biocidas sin diluir tras realizar inóculos de diferentes microorganismos sobre superficies que se asepticen en la práctica diaria en nuestras instalaciones: superficies de plástico y de acero inoxidable. Los inóculos se realizaron con un número de ufc muy superior al que se podría

Resultados

obtener en una contaminación accidental durante una jornada de trabajo dentro del área clasificada. Los resultados se muestran en la tabla 60.

Desinfectante	Microorganismo	Inóculo inicial, ufc (N ₀)	ufc recuperadas tras desinfección, N / (red log)	
			Plástico	Acero
Biocida PH	<i>Staphylococcus aureus</i>	140000	0 (>5,1)	0 (>5,1)
	<i>Micrococcus luteus</i>	150000	0 (>5,2)	0 (>5,2)
	<i>Escherichia coli</i>	92500	0 (>5,0)	0 (>5,0)
	<i>Candida albicans</i>	34000	0 (>4,5)	0 (>4,5)
	<i>Bacillus subtilis</i>	25000	0 (>4,4)	0 (>4,4)
	<i>Aspergillus brasiliensis/niger</i>	4000	0 (>4,0)	0 (>4,0)
Biocida AH	<i>Staphylococcus aureus</i>	140000	0 (>5,1)	0 (>5,1)
	<i>Micrococcus luteus</i>	150000	0 (>5,2)	0 (>5,2)
	<i>Escherichia coli</i>	92500	0 (>5,0)	0 (>5,0)
	<i>Candida albicans</i>	34000	0 (>4,5)	0 (>4,5)
	<i>Bacillus subtilis</i>	25000	10 (3,4)	5 (3,7)
	<i>Aspergillus brasiliensis/niger</i>	4000	0 (>4,0)	0 (>4,0)
Biocida AQ	<i>Staphylococcus aureus</i>	140000	0 (>5,1)	0 (>5,1)
	<i>Micrococcus luteus</i>	150000	0 (>5,2)	0 (>5,2)
	<i>Escherichia coli</i>	92500	0 (>5,0)	0 (>5,0)
	<i>Candida albicans</i>	34000	0 (>4,5)	0 (>4,5)
	<i>Bacillus subtilis</i>	25000	0 (>4,4)	0 (>4,4)
	<i>Aspergillus brasiliensis/niger</i>	4000	0 (>4,0)	0 (>4,0)
Etanol 70%	<i>Staphylococcus aureus</i>	140000	0 (>5,1)	0 (>5,1)
	<i>Micrococcus luteus</i>	150000	0 (>5,2)	0 (>5,2)
	<i>Escherichia coli</i>	92500	0 (>5,0)	0 (>5,0)
	<i>Candida albicans</i>	34000	0 (>4,5)	0 (>4,5)
Isopropanol 70%	<i>Staphylococcus aureus</i>	140000	0 (>5,1)	0 (>5,1)
	<i>Micrococcus luteus</i>	150000	0 (>5,2)	0 (>5,2)
	<i>Escherichia coli</i>	92500	0 (>5,0)	0 (>5,0)
	<i>Candida albicans</i>	34000	0 (>4,5)	0 (>4,5)

Tabla 60. Capacidad bactericida, fungicida y esporicida de los diferentes biocidas sin diluir aplicados a superficies.

Los biocidas con actividad esporicida (PH, AH y AQ) mostraron una efectividad adecuada tanto para bacterias (>4 reducciones logarítmicas) como para hongos y esporas (>3 reducciones logarítmicas) en las pruebas de desinfección sobre superficies aunque el biocida AH presentó una actividad menor frente a esporas de *B. subtilis* (3,4 y 3,7 reducciones logarítmicas en superficies de plástico y acero respectivamente) frente a las 4,4 reducciones de los biocidas PH y AQ.

Los biocidas no esporicidas (Etanol e Isopropanol al 70%) mostraron una adecuada actividad bactericida y fungicida.

5.2.1.a. Verificación de la esterilidad de los desinfectantes con el transcurso del tiempo

Se verificó la esterilidad de todos los biocidas no consumidos en su totalidad hasta 3 meses después de su apertura, ya que la siembra en duplicado de muestras de cada biocida (PH, AH, AQ, Etanol 70% e isopropanol 70%) durante 12 semanas consecutivas en medio TSB, tras su incubación durante 7 días a 20-25°C y 30-35°C, no mostró turbidez en ninguna de las muestras analizadas. Por ello, se estimó adecuado el tiempo de validez de 3 meses de un biocida, una vez abierto.

5.2.2. Diseño, validación e implantación de un procedimiento de limpieza adaptado a las necesidades de la instalación.

La presente validación se realizó utilizando los biocidas que habían proporcionado eficacias bactericidas, fungicidas y esporicidas más altas: Biocida PH (peróxido de hidrógeno) y AQ (dióxido de cloro y amonio cuaternario) en las condiciones y superficies reales de la instalación, utilizando para su aplicación los utensilios indicados en el epígrafe correspondiente de material y métodos, y por el personal encargado de las labores de limpieza.

En el diseño de los procesos de limpieza y desinfección de la instalación se tuvo en cuenta la rotación periódica de los biocidas utilizados, con el fin de prevenir la aparición de resistencias.

La validación del procedimiento de limpieza consistió en la ejecución de 3 limpiezas semanales y 3 mensuales que mostraran consecutivamente resultados satisfactorios en los controles microbiológicos: muestreo y lectura de las placas de contacto CT3P y SC3P tomadas en cada uno de los puntos de control seleccionados al día siguiente de la limpieza:

- 37 superficies de control tras la realización de las limpiezas semanales y
- 71 tras las correspondientes limpiezas mensuales.

Ninguno de los puntos muestreados presentó recuentos de ufc/placa superiores a los criterios de aceptación para los muestreos de superficies mediante placas de contacto (CT3P y SC3P) recomendados en el Anexo I de las NCF (los resultados obtenidos por cada punto de muestreo y validación se muestran en la tabla 61):

- Grado A: < 1 ;
- Grado B: ≤ 5 ;
- Grado C: ≤ 25 ;
- Grado D: ≤ 50 ,

por lo que se consideró adecuado el procedimiento de limpieza implantado.

Resultados

		Validación limpieza mensual			Validación limpieza semanal		
		1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
		CT3P/SC3P	CT3P/SC3P	CT3P/SC3P	CT3P/SC3P	CT3P/SC3P	CT3P/SC3P
SP1	CFL-01i	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-01c	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-01b	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	CFL-02i	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-02c	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-02b	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SAS-01e	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SAS-01s	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP1-INC	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP1-ME	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP1-CFG	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0
	SP1-CAR	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP1-E	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP1-MC	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP1-RE	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SP1-PP	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SP1-P1	0/0	0/0	0/0	-	-	-
SP1-P2	0/0	0/0	0/0	-	-	-	
SP1-T	0/0	0/0	0/0	-	-	-	
SP2	CFL-03i	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-03c	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-03b	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	CFL-04i	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-04c	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-04b	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SAS-02e	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SAS-02s	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP2-INC	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP2-ME	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP2-CFG	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP2-CAR	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP2-E	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0
	SP2-MC	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP2-RE	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SP2-PP	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SP2-P1	0/0	0/0	0/0	-	-	-
SP2-P2	0/0	0/0	0/0	-	-	-	
SP2-T	0/0	0/0	0/0	-	-	-	
SP3	CFL-05i	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-05c	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	CFL-05b	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SAS-03	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SAS-04	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SAS-05	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP3-E	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Resultados

	SP3-MC	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	SP3-RE	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SP3-P1	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SP3-P	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	SP3-T	0/0	0/0	0/0	-	-	-
Vestuario B	VB-B	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0
	VB-S	0/0	0/0	1/0	0/0	1/0	0/0
	VB-PP1	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	VB-PP2	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	VB-PP3	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	VB-RE	0/0	0/0	0/0	-	-	-
	VB-T	0/0	0/0	0/0	-	-	-
Vestuario C	VC-S	6/1	1/2	4/1	4/10	0/0	2/0
	VC-Pomo	0/0	0/1	0/0	-	-	-
	VC-RE	20/1	1/1	18/0	-	-	-
	VC-T	0/0	0/0	0/0	-	-	-
Almacén GMP	AL-S	0/0	0/0	0/0	0/0	13/0	2/0
	AL-Pomo	0/0	0/2	0/0	-	-	-
	AL-P1	1/0	0/0	0/0	-	-	-
	AL-T	0/0	0/0	0/0	-	-	-
Distribuidor	D-S	4/0	0/3	11/6	2/2	17/4	9/6
	D-Pomo	0/0	0/5	0/0	-	-	-
	DI-T	0/0	0/0	0/1	-	-	-
Vestuario D	VD-S	10/7	7/3	10/2	3/0	1/0	35/8
	VD-Pomo	2/0	0/0	0/0	-	-	-
	VD-T	0/0	0/0	0/0	-	-	-

Tabla 61: ufc recuperadas en placas de CT3P y SC3P de 55 mm de diámetro, tras las limpiezas semanales y mensuales, durante el Procedimiento de Validación de la limpieza.

5.3. OBJETIVO 3. IDENTIFICAR LOS PUNTOS CRÍTICOS DE RIESGO DE BIOCONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN EL PROCESO DE FABRICACIÓN ASÉPTICA IMPLANTADO.

5.3.1. ETAPA1: Recogida de datos previos y realización de análisis de riesgos.

Los resultados de la primera etapa en el control de la biocontaminación se recogieron de las monitorizaciones realizadas desde noviembre de 2011 a septiembre 2012, tal y como se indica en la figura 36:

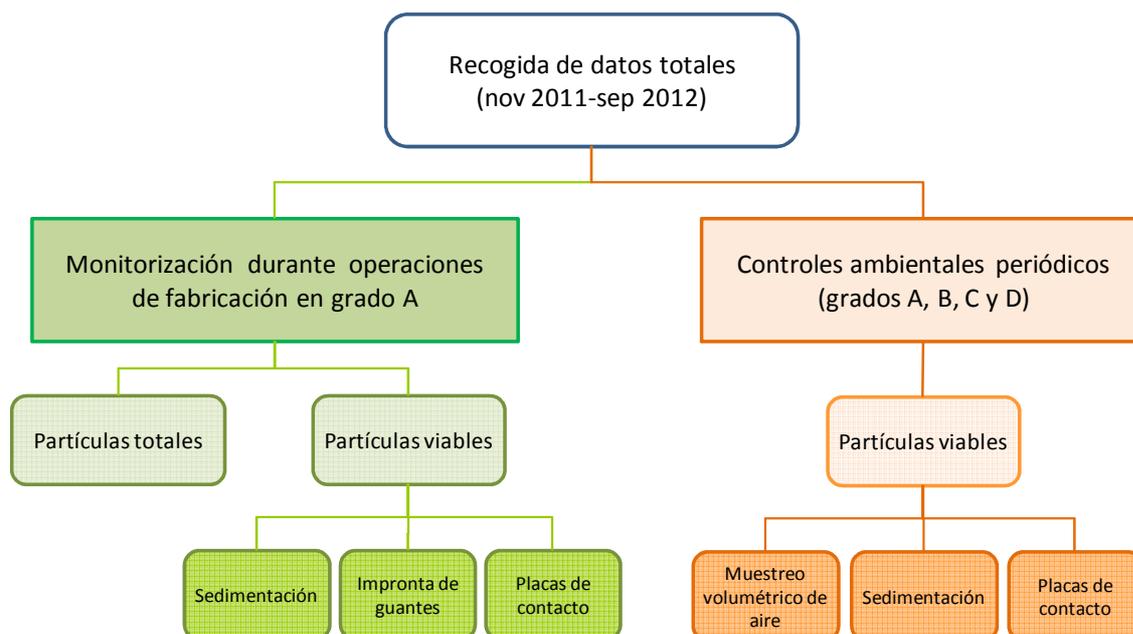


Figura 36. Esquema de las monitorizaciones realizadas durante el periodo de recogida de datos.

5.3.1.a. Resultados de la monitorización de procesos de fabricación en grado A.

i. Monitorización de partículas totales (viables y no viables)

- Hasta septiembre de 2012 se realizaron 97 monitorizaciones de partículas totales en grado A. De ellas, 3 (3,1 %) correspondieron a procesamiento de materiales de partida, 65 (67%) a cambios de medio, 18 (18,6 %) a subcultivos, 3 (3,1 %) al envasado de productos terminados y 8 (8,2 %) al alicotado de medios de cultivo. Las 97 monitorizaciones se subclasificaron según los siguientes rangos de recuento para cada tipo de partícula, todos muy por debajo de los límites de aceptación establecidos por las NCF (3520 partículas/m³ de diámetro $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y 20 partículas/m³ de diámetro $\geq 5,0 \mu\text{m}$):

	Partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}$	Partículas $\geq 5 \mu\text{m}$
• 0 partículas	78	90
• 1-5 partículas	6	6
• 6-20 partículas	13	1
• >20 partículas	0	0

Resultados

En total, en los 97 recuentos se muestrearon 214,5 m³ de aire, detectándose 568 partículas de diámetro $\geq 0,5 \mu\text{m}$ (media = 2,64 partículas/m³ de aire) y 27 partículas de diámetro $\geq 5 \mu\text{m}$ (media = 0,12 partículas/m³ de aire).

ii. Monitorización de partículas viables

Hasta septiembre de 2012 se realizaron 97 monitorizaciones microbiológicas de procesos realizados en grado A, correspondiendo a las mismas operaciones que las realizadas en el apartado anterior, no aislándose ningún microorganismo en las placas de sedimentación, impronta y contacto. Los resultados obtenidos a lo largo de las diferentes mensualidades se muestran en la tabla 62.

	2011		2012								
	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep
Nº monitorizaciones en grado A	0	0	3	25	27	28	3	2	3	4	2
Monitorizaciones positivas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 62. Distribución de las monitorizaciones de partículas viables (N=97) a lo largo del periodo de recogida de datos.

5.3.1.b. Resultados controles ambientales periódicos (semanales y mensuales)

Durante esta etapa inicial de 11 meses, se realizaron controles ambientales semanales y mensuales con el fin de establecer el grado de biocontaminación presente en la instalación. Los resultados obtenidos se muestran teniendo en cuenta los siguientes parámetros (tablas 63 a 68).

- Número de muestreos: cada una de las muestras recogidas, según el tipo de muestreo.
- Ufc aisladas: número total de microorganismos aislados según el número de ufc obtenidas en las diferentes placas en las que se observó crecimiento, independientemente de si superaban o no los niveles de alerta y/o acción.
- Placas positivas: aquellas placas que mostraban 1 o más ufc al final del período de incubación [90].
- Muestras que superan los niveles de alerta o acción: aquellas muestras que superaban o igualan los niveles establecidos.

A. Partículas viables por muestreos volumétricos de aire:

	Nº muestreos	ufc	Placas positivas	Superan niveles de acción Nº (%)	Superan niveles de alerta Nº (%)	Muestreos positivos (%)
Grado A	195	1	1	1 (0,5)	N.A	0,5
Grado B	156	36	24	0 (0)	0 (0)	15,4
Grado C	39	360	35	0 (0)	2 (5,1)	89,7
Grado D	117	2278	114	0 (0)	1 (0,9)	97,4
TOTAL	507	2675	174	1 (0,2)	3 (0,6)	

Tabla 63. Número y porcentaje de partículas totales en los muestreos volumétricos de los diferentes grados

Resultados

Los resultados por cada punto de muestreo se resumen en la siguiente tabla:

		Nº muestreros	ufc	Placas positivas	Superan niveles de acción Nº (%)	Superan niveles de alerta Nº (%)	Muestreros positivos (%)
SP1	CFL-01	39	0	0	0 (0)	N.A	0,0
	CFL-02	39	0	0	0 (0)	N.A	0,0
	A-SP1	39	2	2	0 (0)	0 (0)	5,1
SP2	CFL-03	39	1	1	1 (2,6)	N.A	2,6
	CFL-04	39	0	0	0 (0)	N.A.	0,0
	A-SP2	39	4	4	0 (0)	0 (0)	10,3
SP3	CFL-05	39	0	0	0 (0)	N.A	0,0
	A-SP3	39	6	5	0 (0)	0 (0)	12,8
Vest. B	A-VB	39	24	13	0 (0)	0 (0)	33,3
Vest. C	A-VC	39	360	35	0 (0)	2 (5,1)	89,7
Distribuidor	A-DI	39	700	38	0 (0)	0 (0)	97,4
Almacén D	A-AL	39	753	37	0 (0)	0 (0)	94,9
Vest. D	A-VD	39	825	39	0 (0)	1 (2,6)	100

Tabla 64. Resultados de partículas viables por muestreo volumétrico en cada punto de muestreo

B. Muestreo de sedimentación de partículas viables:

	Nº muestreros	ufc	Placas positivas	Superan niveles de acción Nº (%)	Superan niveles de alerta Nº (%)	Muestreros positivos (%)
Grado A	195	0	0	0 (0)	N.A	0,0
Grado B	216	5	4	0 (0)	0 (0)	1,9
Grado C	39	35	17	0 (0)	0 (0)	43,6
Grado D	117	483	87	0 (0)	0 (0)	74,4
TOTAL	567	523	108	0 (0)	0 (0)	

Tabla 65. Número (%) de partículas totales en los muestreos de sedimentación de los diferentes grados

Los resultados por cada punto de muestreo de sedimentación se resumen en la tabla 66:

		Nº muestreros	Ufc	Placas positivas	Superan niveles acción Nº (%)	Superan niveles alerta Nº (%)	Muestreros positivos (%)
SP1	S-CFL-01	39	0	0	0 (0)	N.A.	0
	S-CFL-02	39	0	0	0 (0)	N.A.	0
	S-CFL-02E	7	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	S-INC-02	39	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	S-CFG-01	39	0	0	0 (0)	0 (0)	0
SP2	S-CFL-03	39	0	0	0 (0)	N.A	0
	S-CFL-04	39	0	0	0 (0)	N.A	0
	S-CFL-03E	7	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	S-INC-04	39	2	1	0 (0)	0 (0)	2,6
	S-CFG-02	39	0	0	0 (0)	0 (0)	0
SP3	CFL-05	39	0	0	0 (0)	N.A.	0

Resultados

	S-SP3	7	0	0	0 (0)	0 (0)	0
Vest. B	S-VB	39	3	3	0 (0)	0 (0)	7,7
Vest. C	S-VC	39	35	17	0 (0)	0 (0)	43,6
Distribuidor	S-DI	39	162	29	0 (0)	0 (0)	74,4
Almacén D	S-AL	39	99	28	0 (0)	0 (0)	71,8
Vest. D	S-VD	39	222	30	0 (0)	0 (0)	76,9

Tabla 66. Resultados de partículas viables en placas de sedimentación en cada punto de muestreo

C. Muestreo de superficies mediante placas de contacto

	Nº muestreos	ufc	Placas positivas	Superan niveles de acción Nº (%)	Superan niveles de alerta Nº (%)	Muestreos positivos (%)
Grado A	420	0	0	0 (0)	N.A.	0
Grado B	1064	34	20	1 (0,1)	7 (0,7)	1,9
Grado C	62	208	25	1 (1,6)	2 (3,2)	40,3
Grado D	170	524	80	0 (0)	2 (1,2)	47,1
TOTAL	1716	766	125	2 (0,1)	11 (0,6)	

Tabla 67. Número y porcentaje de partículas totales en los muestreos de superficies de los diferentes grados

Los resultados por cada punto de muestreo de contacto se resumen en la siguiente tabla:

	Nº muestreos	Ufc	Placas positivas	Superan niveles de acción Nº (%)	Superan niveles de alerta Nº (%)	Muestreos positivos (%)
	CFL-01i	38	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-01c	38	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-01L	8	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-02i	38	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-02c	38	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-02L	8	0	0 (0)	N.A	0
	SAS-01e	38	1	0 (0)	0 (0)	2,6
	SAS-01s	38	2	0 (0)	0 (0)	5,3
SP1	SP1-INC	38	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-ME	38	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-CFG	38	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-CAR	38	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-E	38	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-MC	38	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-RE	8	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-PP	8	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-P1	8	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-P2	8	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP1-T	8	0	0 (0)	0 (0)	0
SP2	CFL-03i	38	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-03c	38	0	0 (0)	N.A	0

Resultados

	CFL-03L	8	0	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-04i	38	0	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-04c	38	0	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-04L	8	0	0	0 (0)	N.A	0
	SAS-02e	38	1	1	0 (0)	0 (0)	2,6
	SAS-02s	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-INC	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-ME	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-CFG	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-CAR	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-E	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-MC	38	1	1	0 (0)	0 (0)	2,6
	SP2-RE	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-PP	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-P1	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-P2	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP2-T	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	<hr/>						
	CFL-05i	38	0	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-05c	38	0	0	0 (0)	N.A	0
	CFL-05L	8	0	0	0 (0)	N.A	0
	SAS-03	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SAS-04	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SAS-05	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
SP3	SP3-ME	38	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP3-E	38	1	1	0 (0)	0 (0)	2,6
	SP3-MC	38	3	1	0 (0)	1 (2,6)	2,6
	SP3-RE	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP3-PP	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP3-P1	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	SP3-T	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	<hr/>						
	VB-B	38	3	3	0 (0)	0 (0)	7,9
	VB-S	38	15	7	1 (2,6)	4 (10,5)	18,4
	VB-PP1	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
Vestuario B	VB-PP2	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	VB-PP3	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	VB-RE	8	7	3	0 (0)	2 (25)	37,5
	VB-T	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	<hr/>						
	VC-S	38	65	17	0 (0)	1 (2,6)	44,7
	VC-PP	8	1	1	0 (0)	0 (0)	12,5
Vestuario C	VC-RE	8	54	7	0 (0)	1 (12,5)	87,5
	VC-T	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
	<hr/>						
	AL-S	38	82	15	0 (0)	1 (2,6)	39,5
Almacén	AL-PP	8	30	3	0 (0)	0 (0)	37,5
GMP	AL-P1	8	1	1	0 (0)	0 (0)	12,5
	AL-T	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0

Resultados

Distribuidor	D-S	38	134	24	0 (0)	0 (0)	63,2
	D-PP	8	13	2	0 (0)	0 (0)	25,0
	DI-T	8	0	0	0 (0)	0 (0)	0
Vest. D	VD-S	39	254	32	0 (0)	1 (2,6)	82,1
	VD-PP	8	9	2	0 (0)	0 (0)	25,0
	VD-T	8	1	1	0 (0)	0 (0)	12,5

Tabla 68. Resultados de partículas viables por muestreo de superficies en cada punto de muestreo.

5.3.1.c. Identificación de microorganismos aislados en zonas de grado A y grado B

5.3.1.c.1. Microorganismos aislados en grado A:

El único muestreo positivo en grado A correspondió a un muestreo volumétrico de aire semanal “en reposo” en la CFL-03 (muestreo 12-020) y fue identificado como *Kocuria rhizophila*.

5.3.1.c.2. Microorganismos aislados en grado B:

En las 24 placas (15,4%) en las que se observó crecimiento de microorganismos en los muestreos volúmetricos de aire en grado B, se aislaron un total de 36 ufc de las que el 94,4% correspondieron a cocos Gram positivos (52,8% del género *Micrococcus* y 38,9% del género *Staphylococcus*). En la figura 37 se muestra la distribución por especies:

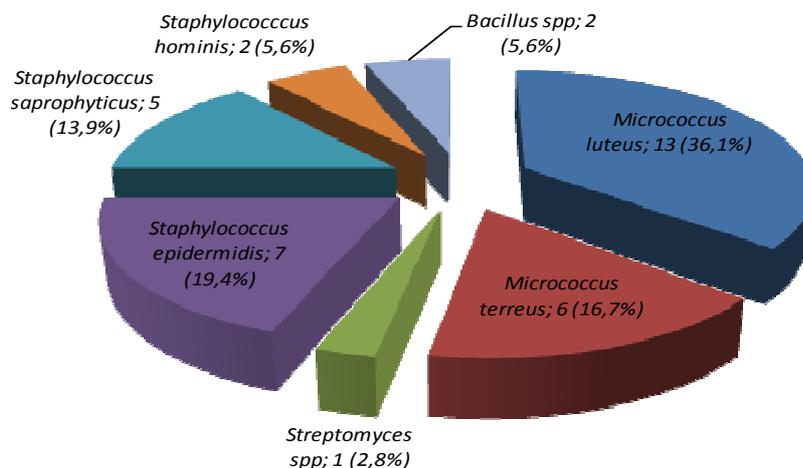


Figura 37: Número y (porcentaje) de microorganismos aislados en grado B. Muestreos volumétricos. Primera etapa.

En las 4 placas (1,9%) en las que se observó crecimiento de microorganismos en los muestreos mediante placas de sedimentación en grado B, se aislaron un total de 5 ufc:

Especie	Nº de ufc aisladas
<i>Micrococcus luteus</i>	2
<i>Corynebacterium spp</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Aspergillus spp</i>	1

Resultados

En las 20 placas (1,9%) en las que se observó crecimiento de microorganismos en los muestreos de superficies por contacto en grado B, se aislaron un total de 34 ufc (55,8% del género *Micrococcus* y el 35,2% correspondientes al género *Staphylococcus*):

Especie	Nº de ufc aisladas
<i>Micrococcus luteus</i>	12
<i>Micrococcus terreus</i>	7
<i>Kocuria rhizophila</i>	1
<i>Corynebacterium spp</i>	1
<i>Streptomyces spp.</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
<i>Staphylococcus hominis</i>	1

El porcentaje total de cada especie aislada en grado B (en los tres tipos de muestreos) puede observarse en la figura 38.

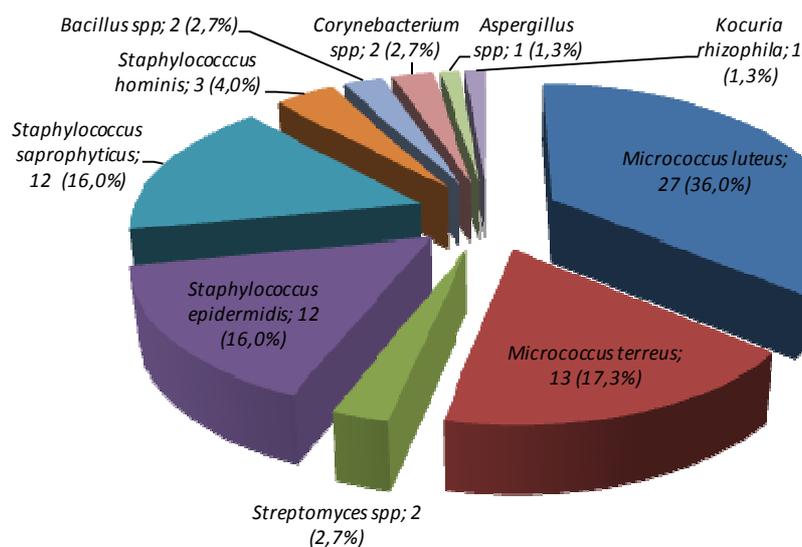


Figura 38. Proporción de los microorganismos aislados en los tres tipos de muestreos en grado B. Primera etapa.

5.3.1.d. Análisis de riesgos. Análisis de las fuentes de contaminación y riesgos asociados. Estimación de puntos de control críticos (PCC).

El proceso de fabricación de CMMAd autólogas se analizó desde el punto de vista del riesgo de biocontaminación utilizando para ello la herramienta de análisis HACCP. Mediante el uso de esta herramienta se intentó establecer cuáles eran las posibles fuentes de biocontaminación y las medidas disponibles para minimizar el riesgo. De este análisis pormenorizado se obtuvieron los puntos para el control de la biocontaminación ambiental, métodos de muestreo y frecuencia de la toma de muestras. Para cada fuente potencial: Personal, Materiales auxiliares, Material de partida y Sistema HVAC, se analizaron los

Resultados

puntos susceptibles de elevar el riesgo de biocontaminación y, en función de ellos, se definieron los Puntos de Control Críticos (PCCs), tal y como se ha descrito en el epígrafe 4.6.1.b. de Material y Métodos.

A partir de este análisis se detectaron 19 PCCs y se establecieron, para cada uno de ellos, métodos de control, niveles críticos de biocontaminación (niveles de acción) y se implantaron, además, medidas correctoras en caso de superación de los mismos (tabla 69). Los niveles de acción durante este período correspondían a los límites recomendados para cada grado por las NCF (tabla 16).

PCC	Plan de control de biocontaminación.	Puntos críticos	Límites críticos (niveles de acción)	Frecuencia	Acciones correctoras superación de niveles acción
1	Muestreo volumétrico de aire de partículas viables en suspensión.	Vestuario D: Muestreo volumétrico: suelo zona central. <i>Superficies críticas:</i> suelo zona central sala.	Volumétrico de aire ≤ 200 ufc/m ³ Placas de contacto (25 cm ²) ≤ 50 ufc	Semanal	Limpieza ocasional del área afectada y muestreo microbiológico mensual de la zona. Si tendencia ascendente o resultados fuera de especificaciones de forma repetida, revisión de los protocolos de entrada y limpieza al área clasificada. Identificación de todos los microorganismos aislados en grado A (género y especie) y B (tinción de Gram). Agua del baño contaminada: inmediata limpieza y aseptización. Para de uso. Es necesario un control negativo previo a su reutilización.
2		Vestuario C: Muestreo volumétrico: suelo zona central. <i>Superficies críticas:</i> suelo zona central sala.	Volumétrico de aire ≤ 100 ufc/m ³ Placas de contacto (25 cm ²) ≤ 25 ufc		
3	Control de superficies con mayor probabilidad de contaminación por partículas procedentes de la descamación de la piel.	Vestuario B: Muestreo volumétrico: sobre banco. <i>Superficies críticas:</i> suelo “zona sucia” y banco.	Volumétrico de aire ≤ 10 ufc/m ³ . Placas de contacto (25 cm ²) ≤ 5 ufc.	Mensual	
		4	Distribuidor: Muestreo volumétrico: zona central sala. <i>Superficies críticas:</i> suelo zona de máxima circulación y carro apoyo de materiales desde el Almacén GMP.	Volumétrico de aire ≤ 200 ufc/m ³ Placas de contacto (25 cm ²) ≤ 50 ufc	
5	Control de superficies con mayor riesgo de contaminación por arrastre desde grado D (materiales introducidos y superficies de las salas). Comprobación del proceso de entrada de materiales. Contaminación agua del baño usado para descongelación (zona no clasificada)		Salas de Producción: <i>Superficies críticas:</i> SAS de entrada, materiales introducidos, superficie sobre la que habitualmente se depositan materiales (carro y mesa), zona de máxima circulación de personal. Laboratorio de control de calidad: <i>Control semanal de la contaminación del agua del baño.</i>	Placas de contacto (25 cm ²) ≤ 5 ufc. Agua del baño (cultivo en medio TSB): ausencia de crecimiento.	
6	Control de superficies con mayor riesgo de contaminación por arrastre y por la manipulación de medios de cultivo.	Cabinas de flujo laminar (grado A): <i>Superficies críticas:</i> zona central de trabajo.	Placas de contacto (25 cm ²) < 1 ufc	Semanal	
		Cabinas de flujo laminar (grado A): <i>Superficies críticas:</i> zona lateral izquierda (depósito de mat. auxiliares de grado B).	Placas de contacto (25 cm ²) < 1 ufc	Mensual	

		Desecho de materiales utilizados en contenedor de desechos.			revaluación del personal de Producción.
7	Muestreo volumétrico de aire de partículas viables en suspensión. Control de superficie con mayor probabilidad de contaminación por partículas de descamación de la piel. Control de superficies usadas para almacenar materiales.	Almacén GMP: Muestreo volumétrico: zona central sala. Superficies críticas: suelo zona central sala y estantería.	Volumétrico de aire ≤ 200 ufc/m ³ . Placas de contacto (25 cm ²) ≤ 50 ufc	Semanal	Limpieza ocasional del área afectada y muestreo microbiológico mensual de la zona. Si tendencia ascendente o resultados fuera de especificaciones de forma repetida, revisión de los protocolos de entrada y limpieza al área clasificada.
8	Control periódico del agua de las bandejas de los incubadores.	Salas de Producción: Superficies críticas: agua de los incubadores.	Control de biocontaminación (bioburden) mediante caldo TSB. Resultado negativo.	Semanal	En caso de crecimiento, se eliminará inmediatamente el agua del incubador con extremo cuidado para no derramarla. Proceder a la limpieza de todo el interior del incubador con esporicida, programar ciclo pirolítico. Extraer y esterilizar bandeja en autoclave. Identificación del microorganismo aislado.
9	Cualificación y formación de personal auxiliar.	Formación inicial y periódica	Superación de las medidas de control de la formación. Aprobación del personal por parte de la Dirección Técnica.	Anual	Formación adicional en normas de vestuario, comportamiento y limpieza en el área clasificada.
10	Control de limpieza semanal. Control de limpieza mensual (rotación de biocidas).	Control de limpieza semanal. Superficies críticas: suelos y superficies de trabajo. Control de limpieza mensual. Superficies críticas: suelos, paredes y superficies de trabajo.	Placas de contacto (25 cm ²) : o Grado A < 1 ufc. o Grado B ≤ 5 ufc. o Grado C ≤ 25 ufc. o Grado D ≤ 50 ufc.	Semanal	Limpieza ocasional de instalaciones.
				Mensual	Formación adicional en normas de vestuario, comportamiento y limpieza en el área clasificada.
11	Control microbiológico (pase a cuarentena y posterior aprobación o rechazo) de medios alicuotados.	Control de contaminación/esterilidad: Inoculación en caldo TSB (bioburden). Ensayo de esterilidad (Eu.Ph.2.6.27) a	Ensayo de bioburden/esterilidad negativo. No superación de límite de partículas	En cada medio alicuotado	Rechazo de lote de medio alicuotado (viales correspondientes)

		partir de septiembre de 2015. En una muestra de cada 10 alícuotas realizadas. Monitorización de proceso en grado A.	para clase A. Placas de sedimentación, impronta y superficies negativas.		Identificación de microorganismos.
12	Control por empresa externa de insectocutores y trampas insecticidas a nivel de suelo.	<i>Área clasificada grado D</i>	Ausencia de insectos en grados C, B y A. Escaso o ningún aislado en Grado D.	Cada 4 meses	Empresa subcontratada. Investigación de causa.
13	Alarmas de temperaturas emitidas por el sistema controlador de los climatizadores. Control visual diario de temperatura del aire de retorno en los climatizadores (temperatura de las salas).	<i>Temperatura (medida en retorno de los climatizadores).</i>	Temperatura ambiental en Salas de Producción, Vestuarios y Distribuidor entre 21 ± 2 °C. Temperatura ambiental del Almacén GMP entre $23,5 \pm 4,5$ °C.	Diario	<ul style="list-style-type: none"> • Aviso a mantenimiento. • Apertura de incidencia si se trata de una desviación reiterada.
14	Control de la temperatura de materiales almacenados a temperatura ambiente y en cámara frigorífica.	<i>Temperatura máxima y mínima en la que se almacenan los materiales auxiliares.</i>	Temperatura ambiental Almacén entre $23,5 \pm 4,5$ °C. Temperatura cámara frigorífica entre 5 ± 3 °C.	Semanal	
15	Cumplimiento continuo de clase según ISO 14644-2 en grado A y B.	<i>Cabinas de flujo laminar y Salas de Producción.</i>	Recualificación sistema HVAC: Recualificación microbiológica:	Semestral	Cambio de pre-filtros G4 y F9 o H14 (HEPA). Parada de actividades, aseptización de la zona y en su caso, descontaminación mediante vaporización.
16	Cumplimiento continuo de clase según ISO 14644-2 en grado C y D.	<i>Vestuario C, Almacén GMP, Distribuidor y Vestuario D.</i>	Recualificación sistema HVAC Recualificación microbiológica	Anual	
17	Cualificación anual de instalaciones. Control periódico de presiones.	<i>Todas las salas.</i>	Presión diferencial: <ul style="list-style-type: none"> • Salas de Producción: 55 ± 5 Pa • Vestuario B: 45 ± 5 Pa. • Vestuario C: 30 ± 5 Pa. • Almacén: 20 ± 5 Pa. • Distribuidor: 20 ± 5 Pa. 	Diario	Cambio de pre-filtros G4 y F9 o H14 (HEPA), según corresponda.
18	Cualificación anual de instalaciones.	<i>Control de humedad relativa.</i>	Entre el 40 y 60 %	Anual	Ajuste de la enfriadora.
19	Contaminación asociada a Materiales de Partida	<i>Contaminación asociada a los tejidos adiposos</i>	Ausencia de crecimiento. Ensayo de esterilidad.	Cada tejido	Descontaminación. Uso de antibióticos en medio de expansión.

Tabla 69. Análisis de Puntos de Control Críticos (PCC).

5.3.2. *Establecimiento de un Plan de Control de la Biocontaminación diseñado a partir del análisis de los Puntos de Control Críticos*

Del análisis de las fuentes de biocontaminación y del riesgo que cada una de ellas supone para la biocontaminación de las instalaciones se estimaron las siguientes medidas con el fin de supervisar los puntos de control críticos y que estructuran el Plan de Control de la Biocontaminación implantado:

- Medida 1: Modificar los puntos de muestreo en los controles ambientales con periodicidad semanal y mensual, así como el periodo de realización de los mismos con el fin de comprobar el periodo durante el cual la instalación se mantiene en adecuadas condiciones. En la UPC este periodo se estimó de 6 días ya que es el período máximo que transcurre entre dos limpiezas semanales consecutivas. Hay que recordar que, en una primera etapa, los muestreos ambientales se realizaban al día siguiente de la limpieza de la instalación con el fin de comprobar la adecuación y efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfectantes utilizados.
- Medida 2: En la monitorización de cada una de las actividades realizadas en grado A se realizará recuento de partículas totales, control de partículas viables mediante placas de sedimentación, impronta de guantes y superficies de trabajo, y se excluirá la monitorización durante los cambios de medio.
- Medida 3: Modificar las Cualificaciones del sistema HVAC y Cabinas de Flujo Laminar, de forma que incluyan:
 - *Semestralmente*: demostrar el cumplimiento continuo de clase en grados A y B según la norma ISO 14644-2, con recuentos de partículas totales “en reposo” y “en funcionamiento” cumpliendo lo descrito en la norma ISO 14644-1, por parte del departamento de Control de Calidad.
 - *Anualmente*: Añadir a la recualificación completa de la instalación en todos los grados subcontratada a una empresa externa (recuentos de partículas totales “en reposo” y “en funcionamiento”, ensayos de integridad y velocidad de impulsión filtros terminales, caudal y renovaciones por hora, recuperación de clase, humedad, temperatura, presiones diferenciales).
- Medida 4: Realizar la Cualificación Microbiológica de la instalación. Este método de ensayo no es obligatorio pero complementa y ayuda a justificar el mantenimiento del plan de control implantado:

Resultados

- *Semestral*. Grados A y B: cumplimiento de “clase microbiológica” según los límites establecidos en el Anexo 1 de las NCF.
 - *Anual*. Grados A, B, C y D: cumplimiento de “clase microbiológica” según los límites establecidos en el Anexo 1 de las NCF. *Evaluación de la Capacidad desinfectante de los SAS pasamateriales*
- Medida 5: Evaluar la biocontaminación de los tejidos adiposos y de los reactivos alicuotados que pasan a formar parte de la sustancia activa.
 - Medida 6: Añadir el recuento de partículas totales “en funcionamiento” en las Salas de Producción (grado B).
 - Medida 7: Incluir un control semanal del agua de los incubadores de CO₂ del área clasificada, grado B.
 - Medida 8: Incluir un control semanal del agua del baño termostatzado, laboratorio de control de calidad.

5.3.3. *ETAPA 2. Implantación de las medidas de control surgidas del análisis de riesgos.*

5.3.3.a. *Medida 1: Resultados de los controles ambientales periódicos*

A continuación, se muestran los resultados obtenidos desde octubre del 2012 a diciembre de 2015. Durante este periodo se realizaron 38 muestreos mensuales y 118 semanales. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (tabla 70 a 73).

A. Muestreos volumétricos de aire:

No se realizaron muestreos volumétricos de aire de forma rutinaria en grado A.

	Nº muestreos	Ufc totales	Placas positivas	Superan niveles de acción (N/%)	Superan niveles de alerta (N/%)	Muestreos positivos (%)
Grado B	481	152	93	0/0	1/0,2	19,3
Grado C	151	533	91	0/0	0/0	60,3
Grado D	338	7710	302	1/0,3	3/0,9	89,3
TOTAL	970	8395	486	1/0,1	4/0,4	

Tabla 70. Número de muestreos volumétricos realizados en cada uno de los grados tras análisis de riesgos.

Los resultados por cada punto de muestreo se resumen en la siguiente tabla:

Resultados

	Nº muestras	ufc	Placas positivas	Superan niveles de acción (N/%)	Superan niveles de alerta (N/%)	Muestreros positivos (%)
SP1	150	51	34	0/0	0/0	22,7
SP2	143	47	30	0/0	1/0,7	21,0
SP3	150	34	18	0/0	0/0	12,0
Vestuario B	38	20	11	0/0	0/0	28,9
Vestuario C	151	533	91	0/0	0/0	60,3
Distribuidor	38	958	34	0/0	1/ 2,6	89,5
Almacén GMP	149	2527	123	0/0	1/0,7	82,6
Vestuario D	151	4225	145	1/0,7	1/0,7	96,0

Tabla 71. Número de placas positivas y de las que superan los niveles de acción en los muestreros volumétricos tras análisis de riesgos.

Las 152 cepas aisladas fueron criopreservadas para su posterior identificación. Tras la descongelación y siembra en medio TSA, 4 (2,6%) cepas no fueron recuperadas. En 11 (7,2%) de las 148 cepas restantes no se obtuvo una identificación fiable utilizando el sistema MALDI TOF. El resto correspondieron a bacterias: 102 ufc (67,1%) a cocos Gram positivos, 18 ufc (11,8%) a bacilos Gram positivos y 3 (2%) a bacilos Gram negativos); y 14 ufc (9,2%) a hongos de los cuales 10 ufc (6,6%) fueron hongos miceliarios y 4 ufc (2,6%) a hongos levaduriformes (*Cryptococcus spp* y *Candida spp.*). Los microorganismos identificados, agrupados por géneros y especies de relevancia, se muestran en la figura 39.

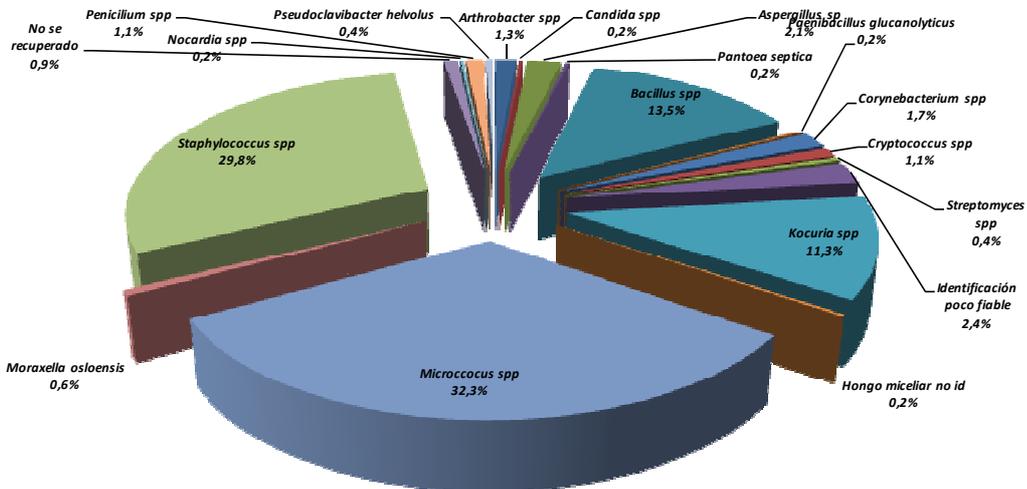


Figura 39. Tipos de microorganismos aislados en los muestreros volumétricos (porcentaje) tras la implantación de las medidas de control de la biocontaminación.

Los microorganismos concretos y el número de ufc aisladas de cada uno de ellos (en los muestreros volumétricos) fueron:

Resultados

• <i>Micrococcus luteus</i>	30
• <i>Micrococcus terreus</i>	16
• <i>Kocuria rhizophila</i>	13
• <i>Staphylococcus hominis</i>	12
• <i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
• <i>Aspergillus spp</i>	9
• <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8
• <i>Kocuria palustris</i>	5
• <i>Bacillus simplex</i>	3
• <i>Kocuria rosea</i>	3
• <i>Arthrobacter pigmenti</i>	2
• <i>Bacillus circulans</i>	2
• <i>Bacillus spp</i>	2
• <i>Bacillus jeotgali</i>	2
• <i>Cryptococcus diffluens</i>	2
• <i>Moraxella osloensis</i>	2
• <i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	2
• <i>Staphylococcus capitis</i>	2
• <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2
• <i>Bacillus licheniformis</i>	1
• <i>Candida spp.</i>	1
• <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1
• <i>Corynebacterium singulare</i>	1
• <i>Cryptococcus sedentarius</i>	1
• <i>Nocardia spp</i>	1
• <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1
• <i>Pantoea septica</i>	1
• <i>Penicilium spp.</i>	1
• <i>Staphylococcus cohnii</i>	1

B. Muestreo de superficies mediante placas de contacto

	Nº muestrs	Ufc totales	Placas positivas	Superan niveles de acción (N/%)	Superan niveles de alerta (N/%)	Muestrs positivos (%)
Grado A	930	2	1	1/0,1	N.A.	0,1
Grado B	2353	342	185	21/0,9	42/1,8	7,9
Grado C	191	297	98	1/0,5	1/0,5	51,3
Grado D	884	2675	588	0/0	4/0,5	66,5
TOTAL	4358	3316	872	23/0,5	47/1,0	

Tabla 72. Número de muestrs de superficie realizados en cada uno de los grados tras Análisis de Riesgos.

Resultados

Los resultados por cada punto de muestreo se resumen en la siguiente tabla:

		Nº muestras	ufc	Placas positivas	Superan niveles de acción (N/%)	Superan niveles de alerta (N/%)	Muestreros positivos (%)
SP1	CFL-01c	152	0	0	0/0	N.A.	0,0
	CFL-01i	38	0	0	0/0	N.A.	0,0
	CFL-02c	152	2	1	1/0,7	N.A.	0,7
	CFL-02i	38	0	0	0/0	N.A.	0,0
	SAS-01e	152	29	12	3/2,0	3/2,0	7,9
	SP1-ME	152	5	3	0/0	1/0,7	2,0
	SP1-CAR	152	10	9	0/0	0/0	5,9
	SP1-Mat	152	4	2	0/0	1/0,7	1,3
	SP1-MC	152	5	4	0/0	0/0	2,6
	SP1-P	38	0	0	0/0	0/0	0,0
SP2	CFL-03c	144	0	0	0/0	N.A.	0,0
	CFL-03i	36	0	0	0/0	N.A.	0,0
	CFL-04c	144	0	0	0/0	N.A.	0,0
	CFL-04i	36	0	0	0/0	N.A.	0,0
	SAS-02e	144	33	12	2/1,4	3/2,1	8,3
	SP2-ME	144	7	4	0/0	1/0,7	2,8
	SP2-CAR	144	3	3	0/0	0/0	2,1
	SP2-MAT	144	5	4	0/0	0/0	2,8
	SP2-MC	144	3	3	0/0	0/0	2,1
	SP2-P	37	11	1	1/2,7	1/2,7	2,7
SP3	CFL-05c	152	0	0	0/0	N.A.	0,0
	CFL-05i	38	0	0	0/0	N.A.	0,0
	SAS-03	38	0	0	0/0	0/0	0,0
	SAS-04	38	0	0	0/0	0/0	0,0
	SAS-05	38	5	3	0/0	1/2,6	7,9
	SP3-ME	152	3	2	0/0	0/0	1,3
	SP3-MC	152	21	6	2/1,3	4/2,6	3,9
	SP3-P	38	0	0	0/0	0/0	0,0
Vestuario B	VB-B	152	20	15	0/0	1/0,7	9,9
	VB-S	152	177	50	13/8,6	26/17,1	32,9
	VB-P	38	1	1	0/0	0/0	2,6
Vestuario C	VC-S	153	253	79	1/0,7	1/0,7	51,6
	VC-Est	38	44	13	0/0	0/0	34,2
Almacén D	AL-S	153	597	107	0/0	0/0	69,9
	AL-Est	153	349	99	0/0	0/0	64,7
	AL-Pomo	38	14	2	0/0	0/0	5,3
	AL-P1	5	0	0	0/0	0/0	0,0
Distribuidor	D-CAR	153	279	93	0/0	0/0	60,8
	D-S	153	563	112	0/0	3/2,0	73,2
	D-Pomo	38	28	13	0/0	0/0	34,2

Resultados

Vestuario D	VD-S	150	758	127	0/0	1/0,7	84,7
	VD-Pomo	41	87	22	0/0	0/0	53,7

Tabla 73. Número de placas positivas y de las que superan los niveles de acción en los muestreos de superficie tras Análisis de Riesgos.

Las 2 ufc aisladas en grado A correspondieron a un muestreo positivo en agosto de 2013 en la zona central de la CFL-02 situada en la Sala de Producción 1. El microorganismo identificado fue *Staphylococcus epidermidis*.

Las 342 cepas aisladas en grado B fueron criopreservadas para su posterior identificación. Tras la descongelación, no fue posible la recuperación de 10 cepas (2,9%) y en 17 (5%) no se obtuvo una identificación fiable. El resto correspondieron a bacterias: 241 ufc (70,5%) a cocos Gram positivos, 65 ufc (19%) a bacilos Gram positivos y 1 (0,3%) a bacilos Gram negativos); y 8 ufc (2,4%) a hongos de los cuales 6 ufc (1,8%) fueron hongos miceliares –uno de ellos no fue posible su identificación- y 2 ufc (0,6%) a hongos levaduriformes (*Cryptococcus spp*). El detalle de los microorganismos identificados agrupados por géneros y especies de relevancia se muestra en la figura 40.

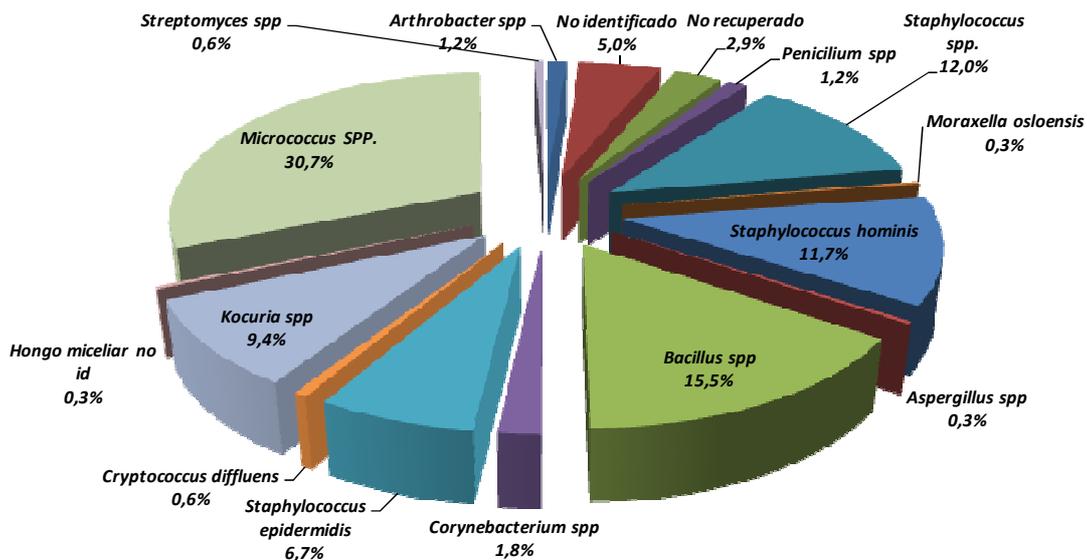


Figura 40. Tipos de microorganismos en los muestreos de superficies (porcentaje) tras la implantación de las medidas de control de la biocontaminación.

Los microorganismos y el número de ufc aisladas de cada uno de ellos en los muestreos de superficie fueron:

- *Micrococcus luteus* 101
- *Staphylococcus hominis* 40
- *Bacillus spp* 35
- *Staphylococcus epidermidis* 23
- *Kocuria palustris* 18

Resultados

• <i>Kocuria rhizophila</i>	12
• <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	11
• <i>Staphylococcus warneri</i>	9
• <i>Bacillus circulans</i>	8
• <i>Staphylococcus capitis</i>	6
• <i>Staphylococcus cohnii</i>	6
• <i>Bacillus simplex</i>	5
• <i>Staphylococcus arlettae</i>	5
• <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4
• <i>Micrococcus terreus</i>	4
• <i>Corynebacterium spp</i>	4
• <i>Penicilium brevicompactum</i>	3
• <i>Bacillus marisflavi</i>	3
• <i>Arthrobacter spp</i>	3
• <i>Streptomyces spp</i>	2
• <i>Bacillus mycoides</i>	2
• <i>Cryptococcus diffluens</i>	2
• <i>Corynebacterium singulare</i>	2
• <i>Penicilium spp</i>	1
• <i>Moraxella osloensis</i>	1
• <i>Kocuria rosea</i>	1
• <i>Arthrobacter pigmenti</i>	1
• <i>Aspergillus spp</i>	1
• Hongo miceliar no identificado	1
• <i>Kocuria kristinae</i>	1

En cuanto a los puntos con mayor índice de contaminación en grado B (figura 41), destacaron la “zona sucia” del Vestuario B (32,9% de muestreos positivos), los SAS pasamateriales de entrada a las Salas de Producción 1 y 2 (7,9 y 8,3% de muestreos positivos respectivamente) y el SAS de salida de la Sala de Producción 3 (7,9%).

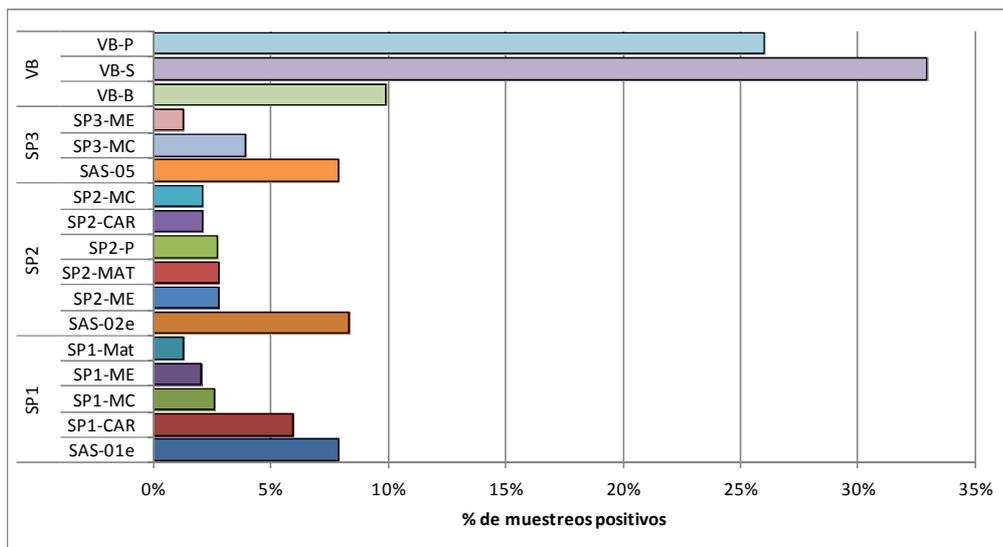


Figura 41. Puntos con mayor índice de contaminación en grado B.

Resultados

El porcentaje de positividades por punto de muestreo en grado C y D se muestran en las figuras 42 y 43 respectivamente.

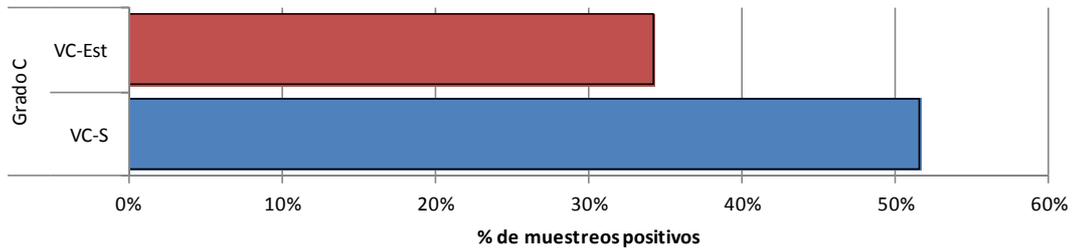


Figura 42. Porcentaje de positividad por punto de muestreo en grado C.

El porcentaje de positividades por punto de muestreo en grado D fue:

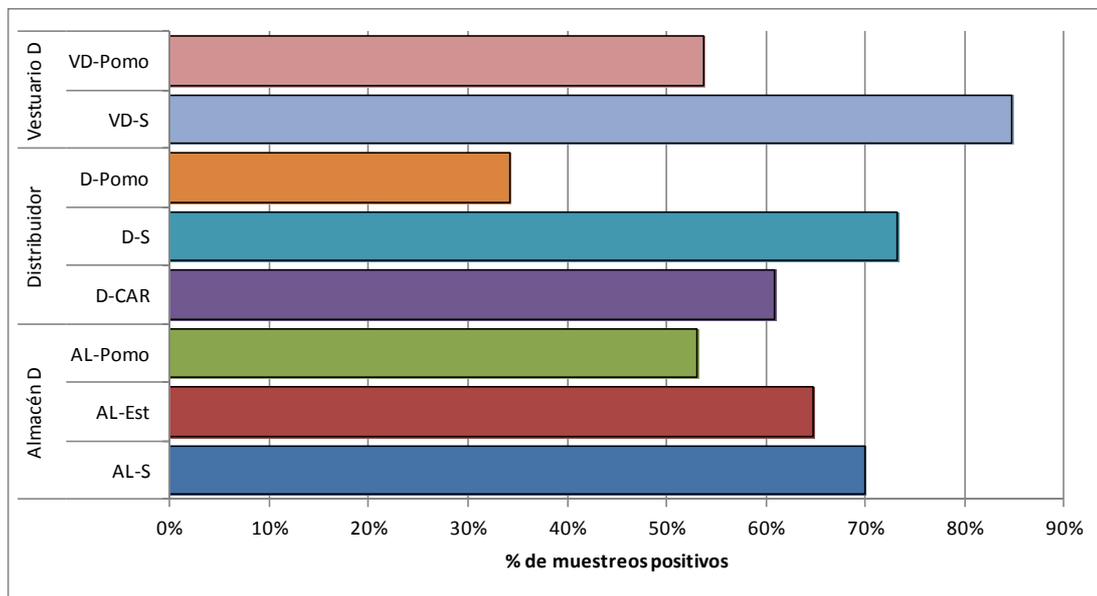


Figura 43. Porcentaje de positividad por punto de muestreo en grado D

5.3.3.b. Medida 2: Cambios en la Monitorización de procesos en grado A.

i. Monitorización de partículas totales

Desde octubre 2012 hasta diciembre de 2015 se realizaron 685 monitorizaciones de partículas totales en grado A. De ellas, 6 (0,9%) correspondieron a descongelaciones, 36 (5,3%) a procesamiento de materiales de partida, 352 (51,4%) a cambios de medio de cultivo, 151 (22%) a subcultivos, 37 (5,4%) al envasado de productos terminados y 103 (15%) al alicuotado de medios de cultivo.

En total se muestrearon 2279,1 m³ de aire, detectándose 1105 partículas de diámetro $\geq 0,5 \mu\text{m}$ (media = 0,48 partículas/m³ de aire) y 110 partículas de diámetro $\geq 5 \mu\text{m}$ (media = 0,048 partículas/m³ de aire). Ambos resultados quedaron muy por debajo

Resultados

de los niveles de aceptación establecidos por las NCF (3520 partículas/m³ de diámetro $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y 20 partículas/m³ de diámetro $\geq 5 \mu\text{m}$). El número de recuentos establecido por rangos fue:

	Partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}$	Partículas $\geq 5 \mu\text{m}$
• 0 partículas	574	649
• 1- 5 partículas	70	28
• 6-20 partículas	41	8
• >20 partículas	0	0

ii. Monitorización de partículas viables

Desde octubre de 2012 a diciembre de 2015 se realizaron 417 monitorizaciones microbiológicas de procesos realizados en grado A (187 en 2013, 107 en 2014 y 123 en 2015); en el último trimestre de 2012 no se realizaron actividades en grado A. De ellas, 6 (1,4%) correspondieron descongelaciones, 36 (8,6%) a procesamiento de materiales de partida, 84 (20,1%) a cambios de medio, 151 (36,2%) a subcultivos, 37 (8,9%) al envasado de productos terminados y 103 (24,7%) al alicuotado de medios de cultivo. De los 352 cambios de medio de cultivo realizados, se monitorizaron microbiológicamente 84 ya que, a partir de septiembre 2013, no se monitorizaron estos procesos al considerarse un proceso no crítico debido al escaso tiempo de exposición y manipulación del producto.

La cronología de las monitorizaciones en grado A fue la siguiente (tabla 74 y figura 44):

		2013											
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Nº Monitorizaciones		1	3	32	28	43	20	12	0	13	14	13	8
Controles Positivos		0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	1
		2014											
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Nº Monitorizaciones		2	9	11	12	4	9	9	11	15	14	6	5
Controles Positivos		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		2015											
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Nº Monitorizaciones		5	12	7	13	6	5	9	11	11	19	16	9
Controles Positivos		0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Tabla 74. Distribución temporal de las monitorizaciones de partículas viables. Tras Análisis de Riesgos.

Resultados

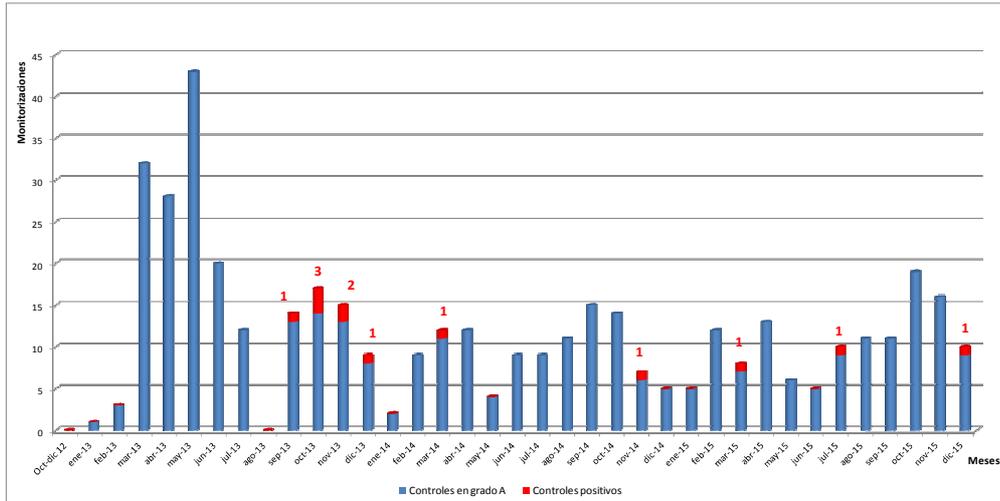


Figura 44. Número total de monitorizaciones de partículas viables en grado A con indicación del número de las que resultaron positivas (rojo) cada mes.

Durante este periodo se obtuvieron 12 resultados (2,87%) resultados que excedieron los niveles de acción permitidos por las NCF (<1 ufc/4h de exposición en las placas de sedimentación y <1 ufc/25cm² en los muestreos de superficies). De ellos, 10 correspondieron a improntas de guantes (8 procedentes de los dedos de la mano izquierda frente a 2 procedentes de la mano derecha) y 2 a muestreos por sedimentación. Se aislaron 20 ufc de las que 2 ufc correspondieron a hongos y el resto a bacterias. El 61,1% de las bacterias resultaron cocos Gram positivos (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis*) y el 38,8% restante, bacilos Gram positivos (*Arthrobacter parietis* y *Bacillus spp.*). En la tabla 75 se muestra un detalle de los resultados.

		Proceso	Control fuera de rango	Nº ufc	Identificación (ufc)
2013	Septiembre	Procesamiento Tejido	Impronta GD	1	<i>Micrococcus luteus</i> (1)
	Octubre	Subcultivo	Impronta GI	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)
		Subcultivo	Impronta GI	2	<i>Micrococcus luteus</i> (1) <i>Staphylococcus hominis</i> (1)
		Envasado	Impronta GI	1	<i>Micrococcus luteus</i> (1)
	Noviembre	Subcultivo	Sedimentación	1	<i>Arthrobacter parietis</i> (1)
		Procesamiento Tejido	Sedimentación	1	<i>Micrococcus luteus</i> (1)
	Diciembre	Subcultivo	Impronta GI	2	<i>Bacillus cereus</i> (1) <i>Bacillus spp</i> (1)
2014	Marzo	Alicuotado	Impronta GI	2	<i>Bacillus spp</i> (2)
	Noviembre	Subcultivo	Impronta GI	1	<i>Micrococcus luteus</i> (1)
2015	Marzo	Procesamiento Tejido	Impronta GI	1	<i>Bacillus spp</i> (1)

Resultados

	Julio	Alicuotado	Impronta GI	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (3)
	Diciembre	Subcultivo	Impronta GD	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1) <i>Bacillus spp</i> (1) <i>Aspergillus versicolor</i> (1) <i>Penicilium</i> (1)

Tabla 75. Monitorizaciones de partículas viables en grado A que excedieron los límites establecidos en las NCF en placas de sedimentación o impronta de guantes e identificación de los microorganismos aislados. GD: guante derecho; GI: guante izquierdo.

En cuanto a los procesos muestreados, mostraron resultados positivos el 8,3% de las operaciones de procesamiento de tejido adiposo, el 3,9% de los subcultivos, el 2,7% de los envasados y el 1,9% de las operaciones de alicuotado. Todos los cambios de medio mostraron resultados negativos (84 monitorizaciones).

5.3.3.c. Medida 3: Modificaciones en las Cualificaciones del sistema HVAC y Cabinas de Flujo Laminar

La cualificación anual del sistema HVAC y CFL se realizó por empresas externas subcontratadas.

La demostración de cumplimiento continuo en las zonas de grado A y B (periodicidad semestral según ISO 14644-2) se realizó por el personal de la UPC y cumplió con los requisitos establecidos en la norma ISO 14644-1. El análisis de los datos queda fuera del ámbito de este estudio.

5.3.3.d. Medida 4: Realizar la Cualificación microbiológica de la instalación y el control de personal

Según los criterios de aceptación establecidos en material y métodos, en cada cualificación microbiológica se ha de cumplir que lo establecido en la tabla 76.

Grado	Muestreo Volumétrico		Muestreo Sedimentación		Muestreo Superficies	
	Nº de muestras	Criterio de aceptación*	Nº de muestras	Criterio de aceptación*	Nº de muestras	Criterio de aceptación*
A	5	0	5	0	5	0
B	14	1	14	1	72	4
C	2	0	2	0	12	1
D	8	0	8	0	36	2

Tabla 76. Criterios de aceptación establecidos en cualificación microbiológica según grados. *número de muestras calculado a partir de los criterios establecidos en material y métodos que pueden superar los límites establecidos en las NCF para cada tipo de muestreo y grado de clasificación ambiental.

Resultados

Durante el periodo objeto de este estudio, se realizaron 4 cualificaciones microbiológicas de la instalación, 2 anuales (grados A, B, C y D) y otras 2 semestrales (grados A y B). Tan sólo en los muestreos de superficies en grado B se superaron, en alguna ocasión (3 muestreos en octubre de 2014, 3 en abril de 2015 y 1 en diciembre 2015), los criterios establecidos en las NCF (<5 ufc/cm²). No se superó, sin embargo, el límite establecido para considerar adecuada la cualificación microbiológica (menos del 5% de los muestreos realizados pueden superar los límites establecidos en las NCF). Los resultados detallados se muestran en la tablas 77 y 78.

Grado	Marzo 2014 Anual			Octubre 2014 Semestral			Abril 2015 Anual			Diciembre 2015 Semestral		
	V	S	C	V	S	C	V	S	C	V	S	C
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	1
C	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-
D	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-

Tabla 77. Número de muestras que superaron los criterios de aceptación establecidos en las NCF en cualificación microbiológica según grados. V, muestreo volumétrico; S, muestreo por sedimentación; C, muestreo de superficies con placas de contacto

De los 7 muestreos de superficies en grado B que superaron los niveles establecidos en las NCF, 5 correspondieron a los muestreos realizados en el ocular de los microscopios presentes en las Salas de Producción 1 y 2. Aunque no es un hecho sorprendente que este punto sea susceptible de poseer niveles de biocontaminación superiores al resto (ya que está en contacto directo con la superficie de piel que rodea los ojos y no se incluyen gafas de protección en los procedimientos de vestuario implantados), sí se considera necesario mantenerlo bajo control y evitar la propagación de la contaminación hacia otras zonas, por ejemplo al tocar con los guantes estériles los oculares y otras zonas del microscopio o instalación. Como medida correctora se implantó la obligatoriedad de limpiar los objetivos del microscopio con el biocida en rotación que corresponda tras cada proceso de fabricación (procesamientos de tejidos, cambios de medio, subcultivos, criopreservaciones y envasados).

Grado	Muestreo	Marzo 2014 (A,B,C y D)	Octubre 2014 (A y B)	Abril 2015 (A,B,C y D)	Diciembre 2015 (A y B)	
		Grado A	V	AC	AC	AC
Grado B	SPI	V	AC	1/(SP1-S1)	AC	AC
		S	1/(SP1-S4)	1/(SP1-S1)	AC	AC
		C	AC	1/(SP1-S2); 8/(MCC) 1/(Silla)	29/(MCC) 2/(Retorno)	27/(MCC); 1/(Silla) 2/(SAS-01e sup. basal)
		AI	AC	AC	AC	AC

Resultados

	SP2	V	AC	4/(SP2-S1)	2/(SP2-S4)	AC
		S	1/(SP2-S1)	AC	AC	AC
		C	1/(rejilla filtro SAS-02e)	16/(MCC)	10/(SP2-P4); 17/(SP2-P7); 18/(MCC); 3/(Pomo INC); 2/(Cristal CFL)	2/(SAS-02e sup. basal)
		AI	AC	AC	AC	AC
	SP3	V	AC	AC	AC	AC
		S		AC		AC
		C		2/(SP3-S3)		1/(SP3-S3); 1/(Silla)
		AI		AC		AC
	Vestuario B	V	AC	1/(VB-S3)	AC	AC
		S	1/(VB-S2)	1/(VB-S3)	AC	AC
		C	1/(VB-P4)	1/(VB-S2); 1/(VB-S3); 1/(Estantería); 4/(material aux); 20/(Retorno)	1/(Retorno)	1/(VB-S1) 2/(VB-S2)
	Grado C	V	7/(VC-S1) 19/(VC-S2)	-	6/(VC-S1)	-
		S	4/(VC-S1) 5/(VC-S2)	-	AC	-
C		1/(VC-S1) 1/(VC-S2) 2/(VC-P4)	-	4/(VC-Retorno)	-	
Grado D	Almacén	V	49/(Alm-S1) 70/(Alm-S2) 55/(Alm-S3)	-	12/(Alm-S1) 12/(Alm-S2) 12/(Alm-S3)	-
		S	5/(Alm-S1) 12/(Alm-S2) 12/(Alm-S3)	-	6/(Alm-S1) 3/(Alm-S2) 2/(Alm-S3)	-
		C	18/(Alm-S1) 3/(Alm-S2) 4/(Alm-S3) 2/(Alm-P3) 2/(Repisas) 7/(material aux) 4/(botón puerta) 3/(pomo)	-	6/(Alm-P4) 6/(Repisas) 1/(Pomo nevera) 2/(Extintor) 1/(Pomo puerta)	-
	Distribuidor	V	110/(DI-S1) 102/(DI-S2) 83/(DI-S3)	-	6/(DI-S1) 5/(DI-S2) 4/(DI-S3)	-
		S	16/(DI-S1) 12/(DI-S2) 10/(DI-S3)	-	4/(DI-S1) 4/(DI-S2) 2/(DI-S3)	-
		C	5/(DI-S1) 9/(DI-S2) 7/(Repisa sup carro)	-	6/(DI-S1) 7/(DI-S3) 4/(Repisa inf carro)	-

Resultados

			9/(Repisa inf carro) 4/(interruptor) 1/(botón puerta)		12/(Rueda1 carro) 15/(Rueda2 carro) 3/(Extintor)	
Vestuario D	V		138/(VD-S1) 121/(VD-S2)	-	58/(VD-S1) 14/(VD-S2)	-
	S		6/(VD-S1) 5/(VD-S2)	-	4/(VD-S1) 1/(VD-S2)	-
	C		6/(VD-S1) 3/(VD-P1) 1/(VD-P2) 2/(VD-P4) 3/(interruptor)	-	7/(Repisa estantería) 9/(Reloj) 14/(Retorno) 4/(Interruptor)	-
Control de personal (Nº personas controladas)			AC (4 personas)	AC (4 personas)	2/(hombro personal limpieza) (6 personas)	AC (8 personas)

Tabla 78. Puntos de muestreo de superficies con resultados positivos (crecimiento de alguna ufc) en las cualificaciones microbiológicas realizadas. Los resultados se expresan como ufc aisladas/(punto de muestreo). MCC: microscopio invertido. AC: ausencia de crecimiento. V, muestreo volumétrico; S, muestreo por sedimentación; C, muestreo de superficies con placas de contacto; AI: agua del incubador.

Evaluación de la Capacidad desinfectante de los SAS pasamateriales

Este control se introdujo en la recualificación anual realizada en abril 2015 y se planificó con una periodicidad anual.

El procedimiento de entrada de materiales al área clasificada depende en gran medida del poder desinfectante de las lámparas UV instaladas en los SAS pasamateriales, siendo conocido que esta capacidad depende del rendimiento de las lámparas UV y su vida media.

El número de ufc recuperadas (N) y la capacidad aseptizante medida como el número de reducciones logarítmicas obtenidas (RL) se muestra en la tabla 79.

Microorganismo	N ₀	SAS-01e		SAS-01s		SAS-02e		SAS-02s		SAS-03		SAS-04		SAS-05	
		N	RL	N	RL	N	RL	N	RL	N	RL	N	RL	N	RL
<i>S. aureus</i>	77000	3	4,4	0	>4,9	0	>4,9	0	>4,9	0	>4,9	0	>4,9	0	>4,9
<i>P. aeruginosa</i>	60500	44	3,1	29	3,3	12	3,7	18	3,5	0	>4,8	0	>4,8	7	3,9
<i>C. albicans</i>	73000	0	>4,9	0	>4,9	3	4,4	0	>4,9	0	>4,9	0	>4,9	0	>4,9

Tabla 79. Capacidad desinfectante de los SAS pasamateriales evaluada por las reducciones logarítmicas del inóculo inicial (N₀). N: ufc recuperadas tras ciclo UV; RL: reducciones logarítmicas

Resultados

Todos los SAS pasamateriales mostraron una capacidad de desinfección UV superior a 3 reducciones logarítmicas aunque los SAS 03, 04 y 05 mostraron reducciones mayores. La diferencia de estos SAS respecto al 01 y 02 es la presencia de 4 lámparas UV en los primeros (SAS 03, 04 y 05) y tan sólo 1 en los últimos (SAS 01 y 02), lo que puede explicar su mayor capacidad desinfectante.

5.3.3.e. Medida 5: Evaluar la biocontaminación de los tejidos adiposos recibidos y de los reactivos alicuotados que pasan a formar parte de la sustancia activa.

5.3.3.e.1. Biocontaminación de los tejidos adiposos

Hasta marzo de 2016 se recibieron 22 muestras de tejido adiposo, extraídas mediante exéresis quirúrgica de la grasa subcutánea de la zona abdominal, para su procesamiento.

Los cultivos realizados a partir del suero fisiológico que acompaña al tejido adiposo resultaron positivos en 15 ocasiones (68%). Tras la correspondiente siembra en medios sólidos para el aislamiento e identificación de los gérmenes contaminantes, se observó que en 5 de ellos (22%) la contaminación era polimicrobiana. De los 21 gérmenes aislados, predominaron *Staphylococcus epidermidis* (28,5%, n=6), *Staphylococcus capitis* (19%, n=4) y *Streptococcus oralis* (14,2%, n=3).

En cuanto a la procedencia de los microorganismos identificados, *Staphylococcus capitis* coloniza principalmente la piel de la cara, cuello, cuero cabelludo y orejas. *Streptococcus oralis* es una variedad de *Streptococcus viridans* y forma parte de la flora bacteriana de la boca humana y *Moraxella catarrhalis* es el tercer patógeno más importante en el tracto respiratorio humano después de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* [125]. *Propionibacterium acnes* es un anaerobio estricto que habitualmente coloniza cara, torso y espalda.

Se ensayó la sensibilidad a gentamicina y vancomicina por ser los ingredientes del medio de lavado que se utilizan para la descontaminación del tejido a su llegada a la UPC. El detalle de los resultados obtenidos se muestra en la tabla 80.

Lote de tejido	Microorganismos aislados	Sensibilidad a Vancomicina	Sensibilidad a Gentamicina
13-002	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S
14-009	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	S	S
14-010	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R
15-002	<i>Staphylococcus capitis</i>	S	S
	<i>Clostridium perfringens</i>	S	R
15-004	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S
	<i>Streptococcus oralis</i>	S	S

Resultados

15-006	<i>Staphylococcus capitis</i>	S	S
15-007	<i>Bacillus cereus</i>	S	S
	<i>Streptococcus oralis</i>	S	S
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S
15-008	<i>Staphylococcus capitis</i>	S	S
15-009	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	R	S
15-010	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S
15-011	<i>Staphylococcus capitis</i>	S	S
15-013	<i>Propionibacterium acnes</i>	S	S
15-014	<i>Staphylococcus caprae</i>	S	S
15-016	<i>Streptococcus oralis</i>	S	S
	<i>Streptococcus mitis</i>	S	S
16-002 ELA	<i>Propionibacterium acnes</i>	S	S

Tabla 80. Microorganismos aislados a partir de tejidos adiposos usados como materiales de partida. Sensibilidad a gentamicina y vancomicina. S, sensible; R, resistente.

Tras la descontaminación y en las siguientes fases de cultivo y expansión celular, no se observó contaminación de los cultivos celulares y los ensayos de esterilidad realizados a sustancias activas y productos terminados resultaron en todos los casos negativos. Se consideró que las medidas de descontaminación eran lo suficientemente eficaces para eliminar la contaminación procedente de los materiales de partida.

A pesar de ello, la descontaminación del tejido se realizaba en el interior del área clasificada y, aún resultando eficaz, suponía un riesgo para el proceso y un punto de entrada de biocontaminación a la instalación. Además, no se utilizaban sustancias antimicrobicas ni fungicidas con el fin de prevenir la contaminación con levaduras y hongos presentes en la piel humana. Por ello, para disminuir el riesgo de contaminación a partir del material de partida, a partir de Marzo de 2016, comenzó a utilizarse el medio comercial BASE 128 (AL.CHI.MI.A. SRL, Italy) compuesto por una mezcla de 3 antimicrobianos (vancomicina, gentamicina y cefotaxima) y anfotericina B como agente antifúngico. Este medio se adiciona al material quirúrgico por el equipo encargado de la extracción del tejido y se mantiene durante todo el transporte del tejido desde el centro extractor hasta la UPC (tiempo medio de transporte: 3 horas).

Desde la implantación de esta medida, no se ha observado contaminación en los 10 tejidos adicionales recibidos hasta la fecha ni ningún efecto adverso en los cultivos celulares.

5.3.3.e.2. Biocontaminación de los reactivos alicuotados

Entre enero de 2013 y diciembre de 2015 se realizaron 103 sesiones de trabajo en grado A para alicuotar un total de 165 lotes de medios entre los que se incluyeron suero bovino fetal, DMSO, medio de expansión, tripsina, colagenasa, TSB utilizado en los procesos de Media Fill, PBS, glutamina y Glutamax (tabla 81). Hasta septiembre de 2015 se realizó un control de contaminación (bioburden) a cada 10 alícuotas realizadas (siembra en medios de TSB e incubación a 20-25 °C y 30-35°C durante 7 días). A partir de entonces y según indicación de la AEMPS se realizó ensayo de esterilidad según Farmacopea Europea 2.6.27 [113] a cada 10 alícuotas realizadas.

	2013	2014	2015
Sesiones de alicuotado	33	38	32
Medios alicuotados	54	65	46
Monitorizaciones positivas (por bioburden o esterilidad)	0	1	0

Tabla 81. Número de medios alicuotados y número de controles positivos.

De los 165 lotes de medio alicuotados, en uno de ellos (0,6%) la alícuota obtenida para control de la biocontaminación mostró resultado positivo (*Staphylococcus epidermidis*). Se descongelaron las 9 alícuotas restantes de la misma tanda de trabajo para proceder a su destrucción, previo control de cada una de ellas. Ninguna de las restantes alícuotas mostró turbidez.

5.3.3.f. Medida 6: Añadir el recuento de partículas totales “en funcionamiento” en las Salas de Producción (grado B).

Se realizaron recuentos mensuales de partículas en grado B tomando 1 m³ de aire en cada una de las Salas de Producción “en funcionamiento”. Los recuentos se realizaron en condiciones reales de trabajo y, por tanto, con diferencias en cuanto al número de personas presentes en la habitación y la naturaleza de las actividades realizadas (p. ej.: aseptización de materiales en las zonas cercanas al embudo colector, acción que aumenta considerablemente el número de partículas en suspensión).

Los niveles de partículas totales se mantuvieron siempre por debajo de los criterios de aceptación establecidos para cada una de ellas en grado B (352.000 partículas de tamaño $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ y 2.900 de tamaño $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$) (figuras 45 y 46).

Resultados

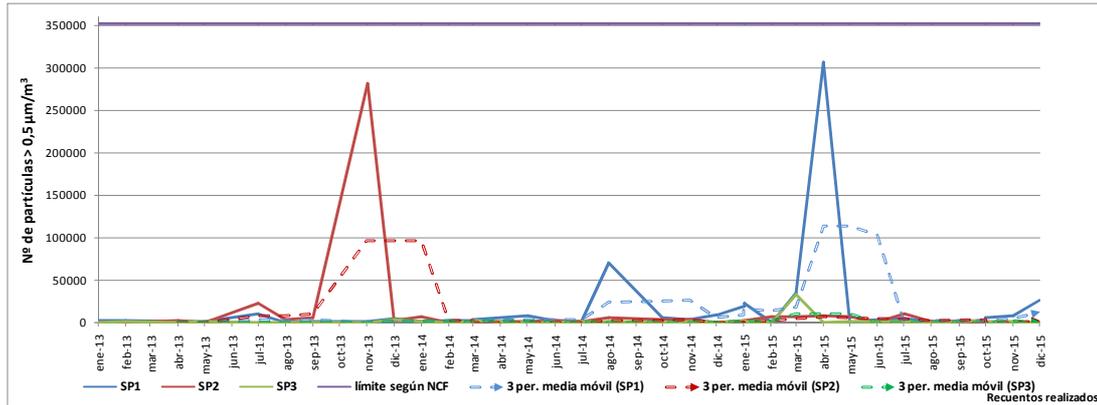


Figura 45. Número de partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}^3$ en muestreos mensuales en grado B “en funcionamiento”. El límite según las NCF se representa con una línea morada.

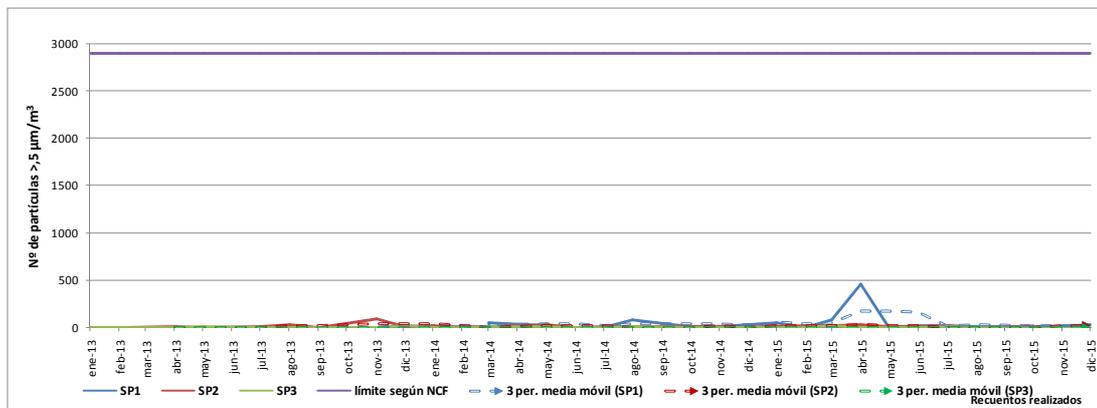


Figura 46. Número de partículas $\geq 5 \mu\text{m}^3$ en muestreos mensuales en grado B “en funcionamiento”. El límite según las NCF se representa con una línea morada.

5.3.3.g. Medida 7: Incluir un control semanal del agua de los incubadores de CO_2 del área clasificada, grado B.

El control de la contaminación del agua de los incubadores es extremadamente importante ya que las condiciones atmosféricas de temperatura y humedad favorecen el desarrollo de posibles contaminantes, como bacilos Gram negativos y especialmente hongos miceliares; estos últimos pueden diseminar sus esporas hacia otras zonas del incubador, cultivos celulares e incluso hacia el exterior (derrames accidentales de agua por ejemplo o dispersión de esporas a la apertura de puertas), pudiendo contaminar otras zonas de grado B.

Durante noviembre y diciembre de 2012 se realizaron 8 controles semanales del agua de los 8 incubadores situados en las Salas de Producción. Las 64 muestras resultaron negativas (ausencia de turbidez del medio de incubación tras 7 días de incubación a 20-25 °C y 30-35 °C simultáneamente).

Resultados

En enero de 2013, tras la cualificación de equipos realizada por una empresa subcontratada, durante un muestreo rutinario mensual se observó la presencia de un micelio aéreo en la bandeja de agua de uno de los incubadores (incubador 7) situado en la Sala de Producción 1. Se procedió a tomar muestras del agua y de superficies del incubador (filtro, pared lateral, techo y superficie basal del incubador y lateral de la cubeta de agua).

Las muestras de agua sembradas en medio TSB se incubaron por duplicado a 20-25°C y a 30-35 °C durante 7 días; en ambos tubos se observó la presencia de turbidez. Tras la correspondiente siembra en medios de TSA se identificó la cepa como *Aspergillus spp* en ambos tubos.

Las placas de contacto se incubaron a 20-25 °C durante 3 días seguidas de una incubación a 30-35 °C durante 2 días. Al finalizar el periodo de incubación se observó la presencia de 6 ufc de *Aspergillus spp* en la placa correspondiente al lateral de la cubeta y 7 ufc en la superficie basal del incubador.

Tras la toma de muestras se procedió al aspirado del agua del incubador (mediante bomba de vacío). Con el fin de eliminar posibles contaminantes de las diferentes piezas del incubador, se extrajeron los rieles, bandejas y cubeta de agua, se aseptizaron con peróxido de hidrógeno y se esterilizaron mediante autoclave. Se aseptizaron igualmente todas las superficies internas del incubador. Una vez equipado el incubador con todas sus piezas se tomaron muestras en los mismos puntos no observándose crecimiento de microorganismos.

Transcurrido un mes desde la puesta en marcha del incubador 7, se observó la presencia de un micelio aéreo en la superficie del agua de dos de los incubadores situados en la Sala de Producción 1 (incubadores 7 y 8). Se tomaron muestras en diferentes zonas interiores del equipo (tabla 82).

Tipo de muestreo	Punto de muestreo		Resultado (ufc/m ³)	Identificación
Volumétrico de aire (TSA 90 mm ³)	Zona interior del incubador 7		>100	<i>Aspergillus spp.</i>
	Zona interior del incubador 8		33	
Tipo de muestreo	Punto de muestreo		Resultado (ufc/25cm ²)	Identificación
Superficies con placas de contacto incubador 7	Bandejas	Superior	18	<i>Aspergillus spp</i>
		Intermedia superior	5	
		Intermedia inferior	9	
		Inferior	13	
	Paredes	Lateral izquierda	0	
		Lateral derecha	0	
		Fondo (zona superior)	0	
		Fondo (zona inferior)	19	
	Techo	Fondo	0	

Resultados

		Zona frontal	0
		Filtro HEPA	Incontables
Superficies con placas de contacto incubador 8	Bandejas	Superior	13
		Intermedia superior	8
		Intermedia inferior	1
		Inferior	19
	Paredes	Lateral izquierda	1
		Lateral derecha	0
		Fondo (zona superior)	3
		Fondo (zona inferior)	1
	Techo	Fondo	0
		Zona frontal	12
		Filtro HEPA	Incontables

Tabla 82. Número y localización de las ufc de *Aspergillus spp.* detectadas en los controles microbiológicos realizados a los incubadores 7 y 8.

Tras la toma de muestras se procedió a retirada mediante bomba de aspiración del agua de ambos incubadores y al desmontaje de piezas extraíbles y asepsización mediante solución biocida de dióxido de cloro y amonio cuaternario (KlercideTM Sporicidal Chlorine/Quat) de bandejas, cubetas y rieles y su posterior esterilización en autoclave. Finalmente se equiparon ambos incubadores con sus respectivas piezas y se realizó un ciclo pirolítico, programa equipado en los incubadores afectados. Tras la realización del ciclo pirolítico se tomaron muestras en los mismos puntos anteriores sin observar crecimiento en ninguno de ellos.

Como consecuencia de la contaminación observada, se decidió sustituir temporalmente el método de humectación de los incubadores de CO₂ por un método con menor riesgo de contaminación. Se sustituyeron entonces las bandejas de agua por frascos de cultivo celular de 175 cm² llenos de agua estéril a los que se les quitó el tapón de rosca con el fin de exponer el líquido y proporcionar así la humedad necesaria para el crecimiento celular, reduciendo considerablemente la superficie de exposición del agua al medio ambiente.

Mensualmente se sustituyeron los frascos llenos de agua por otros nuevos con agua estéril. Los controles se realizaron semanalmente. Durante el resto del año 2013 se realizaron 80 controles adicionales del agua de los incubadores (10 controles a cada uno de los 8 incubadores presentes en el área clasificada), no observándose crecimiento de microorganismos (ausencia de turbidez del medio líquido TSB).

A pesar de la eficacia en el control de la biocontaminación del agua de los incubadores, se observó una disminución de la capacidad de crecimiento celular debido a que este método no lograba proporcionar los niveles de humedad óptimos

Resultados

(aproximadamente el 95%). Unos meses más tarde, en enero de 2014, se volvió al sistema anterior de humectación con las bandejas de agua rellenas de agua destilada estéril. Los cambios de agua se realizaron mensualmente mientras que el control de contaminación se programó con periodicidad semanal.

En diciembre de 2013 se incorporaron 2 incubadores más a las Salas de Producción. Se realizaron 510 muestreos (51 muestreos en cada uno de los 10 incubadores) durante el año 2014 y 500 muestreos (50 muestreos en cada uno de los 10 incubadores) durante el año 2015 resultando todos ellos negativos (ausencia de turbidez del medio TSB).

5.3.3.h. Medida 8: Incluir un control semanal del agua del baño termostatzado del laboratorio de control de calidad.

El baño termostatzado, se encuentra ubicado en el laboratorio de Control de Calidad, fuera del área clasificada y por tanto en un entorno ambiental no controlado. Se utiliza para la descongelación de suspensiones de células mesenquimales criopreservadas antes de ser introducidas al área clasificada (grado A) y para la descongelación de suplementos de medios de cultivo celular.

El elevado riesgo de contaminación del baño mediado por microorganismos presentes en el ambiente, hacen que sea una potencial fuente de contaminación desde el que se pueden introducir microorganismos en las Salas de Producción.

El plan de control semanal del agua del baño termostatzado se implantó en abril de 2013. En los 21 controles realizados el resto del año todos los resultados fueron negativos.

En 2014 se realizaron 51 muestreos, de los que 6 (11,7%) resultaron positivos (turbidez del medio TSB) y se correspondieron a contaminaciones por una única cepa microbiana en cada uno de ellos. Las cepas aisladas se identificaron como *Ralstonia picketti* (4 aislamientos), no siendo posible la identificación en otros 2 aislamientos.

En 2015 se realizaron 50 muestreos, resultando positivos 9 (18%) de ellos. Al igual que en los anteriores casos de contaminación, se aisló un único microorganismo contaminante en cada uno de los controles positivos. Los microorganismos fueron identificados como *Ralstonia picketti* (6 aislamientos) y *Kocuria rhizophila* (3 aislamientos).

A partir de la última contaminación observada, se adicionó como medida preventiva un sobre con 10 gr de desinfectante Rely+On™ Virkon (Antec International, Dupont

Resultados

Ibérica S.L., Barcelona. España) a los 14 litros de agua destilada del baño. El agua se renovó a partir de entonces una vez al mes, mientras que los controles se realizaron semanalmente. Desde la adicción del desinfectante Virkon, hasta la fecha de inicio de redacción de este estudio no se observó contaminación en ninguno de los 53 muestreos realizados alguna.

5.4. OBJETIVO 4. EVALUAR LOS DATOS DE BIOCONTAMINACIÓN AMBIENTAL MEDIANTE HERRAMIENTAS BASADAS EN ANÁLISIS DE TENDENCIAS. VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS PROCEDIMIENTOS IMPLANTADOS.

El presente análisis de tendencias se realizó mediante el análisis de los resultados obtenidos tras el análisis de riesgos realizado (octubre 2012 a diciembre 2015).

Los microorganismos aislados en los muestreos volumétricos y de superficies (n=494) que pudieron ser recuperados e identificados (n=452) se agruparon en los 4 géneros predominantes (figura 47) y se realizó una distribución anual de cada uno de los grupos para examinar el tipo de evolución (tabla 83) con el fin de observar si se producían cambios en la microflora presente en la instalación. Los cocos Gram positivos de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Kocuria* constituyeron el 71,4% de los microorganismos aislados y los bacilos Gram positivos del género *Bacillus* el 13,4%. El resto de microorganismos no incluidos en uno de los 4 géneros principales estaba formado por un grupo heterogéneo de bacterias y hongos (ver epígrafe 5.3.3.a.).

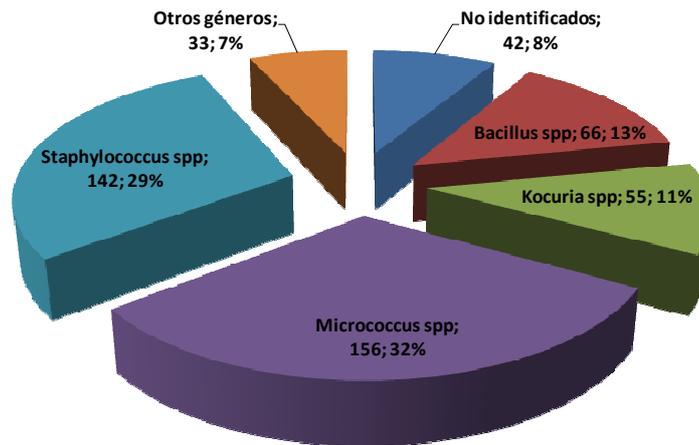


Figura 47. Número y (porcentaje) de microorganismos aislados en los muestreos volumétricos y de superficies agrupados por géneros de mayor relevancia

La distribución por año se muestra en la tabla 83:

Año	<i>Bacillus spp</i>	<i>Kocuria spp</i>	<i>Micrococcus spp</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	Total 4 géneros
2013	14 (20)	6,3 (9)	39,9 (57)	25,2 (36)	85,3 (122)
2014	14 (19)	18,4 (25)	25,7 (35)	22,1 (30)	80,1 (109)
2015	12,8 (22)	9,9 (17)	22,7 (39)	41,3 (71)	86,6 (149)

Tabla 83. Distribución temporal de los 4 géneros predominantes. Porcentaje del total de microorganismos (número de ufc).

Resultados

Dado que en muchas ocasiones, las ufc recuperadas de los controles ambientales de superficies crecen en forma de “cluster” o agrupadas, se consideró interesante establecer la frecuencia de aislamientos (independientemente del número de ufc aisladas), de los 4 géneros comúnmente aislados en los muestreos rutinarios en grado B (figura 48):

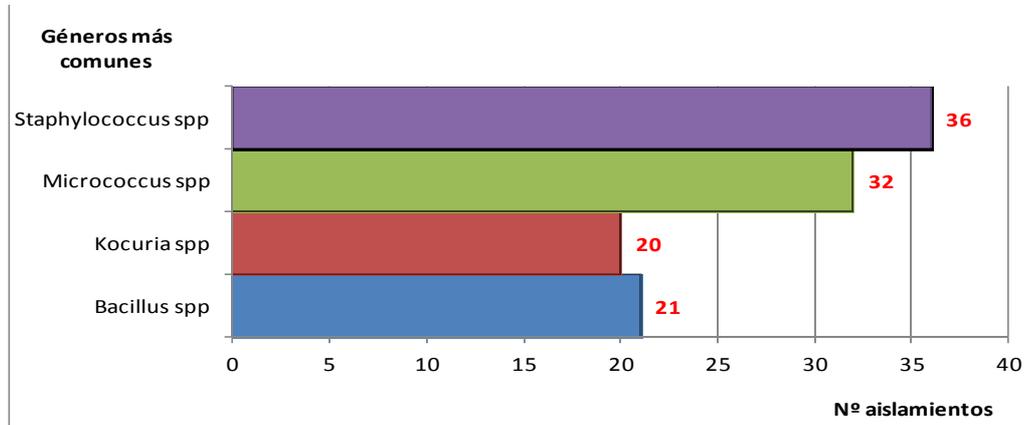


Figura 48. Frecuencia de aislamiento de los 4 géneros más comunes aislados (monitorización volumétrica y de superficies).

La comparativa de los microorganismos aislados en los muestreos de superficies y volumétricos se muestra en la tabla 84.

Tipo de muestra y número de aislamientos	Cocos Gram +	Bacilos Gram +	Bacilos Gram -	Hongos
Muestras de superficies, 315 cepas	77,5% (241)	20,6% (65)	0,3% (1)	2,5% (8)
Muestreos volumétricos, 137 cepas	74,5% (102)	13,1% (18)	2,2% (3)	10,2% (14)

Tabla 84. Tipos de microorganismos aislados en los controles volumétricos de aire versus muestreos de superficies.

Del total de cepas aisladas e identificadas en los muestreos volumétricos y de superficies (143 en 2013, 136 en 2014 y 172 en 2015), el 85,3% (n=122) correspondieron a gérmenes de los 4 principales géneros en 2013, el 80,1 % (n=109) en 2014 y el 71% (n=149) en 2015.

Al observar la distribución de los 4 géneros más comunes por años (tabla 83), se pudo observar que la contaminación por *Micrococcus spp.* predominó en 2013 y 2014, con un aumento de contaminación por *Kocuria spp.* en 2014 con respecto a los otros dos años, y que en 2015, las contaminaciones mayoritarias detectadas fueron por *Staphylococcus spp.*

Establecimientos de niveles de alerta y acción eficaces

Durante el período de puesta a punto de la instalación, el *nivel de alerta* para los resultados obtenidos de los muestreos volumétricos y de superficies se estableció en

Resultados

el 60% del valor establecido para cada grado de clasificación según el Anexo 1 de las NCF:

- para los resultados de los muestreos volumétricos: 6 ufc (grado B), 60 ufc (grado C) y 120 ufc (grado D).
- para los resultados de los muestreos de superficies: 3 ufc (grado B), 15 ufc (grado C) y 30 ufc (grado D).

El *nivel de acción* se estableció en los valores límites recomendados por el mencionado anexo para cada grado de clasificación:

- para los resultados de los muestreos volumétricos: 10 ufc (grado B), 100 ufc (grado C) y 200 ufc (grado D) y
- para los resultados de los muestreos de superficies: 5 ufc (grado B), 25 ufc (grado C) y 50 ufc (grado D).

A partir de entonces, con los resultados estadísticos obtenidos al final de una anualidad, se establecieron los niveles de alerta y acción en el percentil 95 (P_{95}) y percentil 99 (P_{99}), respectivamente, para la anualidad siguiente (siempre y cuando el nivel de acción no superara los límites establecidos en las NCF). Se estimó un periodo de revisión anual con el fin de adaptarlos al estado real de utilización de la instalación.

Muestreos volumétricos

En la tabla 85 se muestran los resultados estadísticos de los años 2012, 2013 y 2014 y los niveles de alerta y acción establecidos para cada anualidad a partir de los resultados obtenidos en el año anterior.

Grados	2012			2013			2014			2015		
	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D
N	140	35	105	160	49	111	158	49	108	151	49	111
Mediana	0	3	13	0	2	14	0	2	18	0	0	9
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	5	95	128	4	22	99	6	58	110	5	8	195
P_{95}	1	82,2	66	2	20	61,2	2	24	78,2	1	6,51	70,2
P_{99}	4,59	nr	126,02	4	nr	97,44	5,41	nr	109,64	3,96	nr	192,24

Grados	Niveles de alerta y acción											
	2013			2014			2015			2016		
	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D
Nivel alerta	1	82	66	2	20	61	2	24	78	1	7	70
Nivel acción	5	95	126	4	22	97	5	58	110	4	8	192

Tabla 85. Resultados estadísticos de los muestreos volumétricos para el cálculo de niveles de alerta y acción y valores de establecimiento de los mismos expresados en número de ufc. Los valores de los percentiles se redondearon a números enteros. En el caso de que el percentil 99 no mostrara resultados (nr) al poseer un número limitado de valores, se seleccionó como nivel de acción el valor

Resultados

máximo de la serie. En la parte inferior de la tabla se muestran los niveles de alerta y acción obtenidos a partir de los datos estadísticos del año anterior.

De los 469 muestreos volumétricos realizados en grado B entre 2013 y 2015, el 80,8% (n=379) mostraron resultados de 0 ufc y el 12,2% (n=57) de 1 ufc. En el caso de los resultados de los muestreos realizados en grado C (n=147), en el 40,8% (n=60) de los casos se obtuvieron 0 ufc y en el 13,6% (n=20), 1 ufc.

Los gráficos de evolución de tendencias para los resultados de los muestreos volumétricos en cada una de las salas del área clasificada, junto con los niveles de alerta (en naranja) y acción (en rojo) establecidos en cada momento se muestran en las figuras 49 a 56.

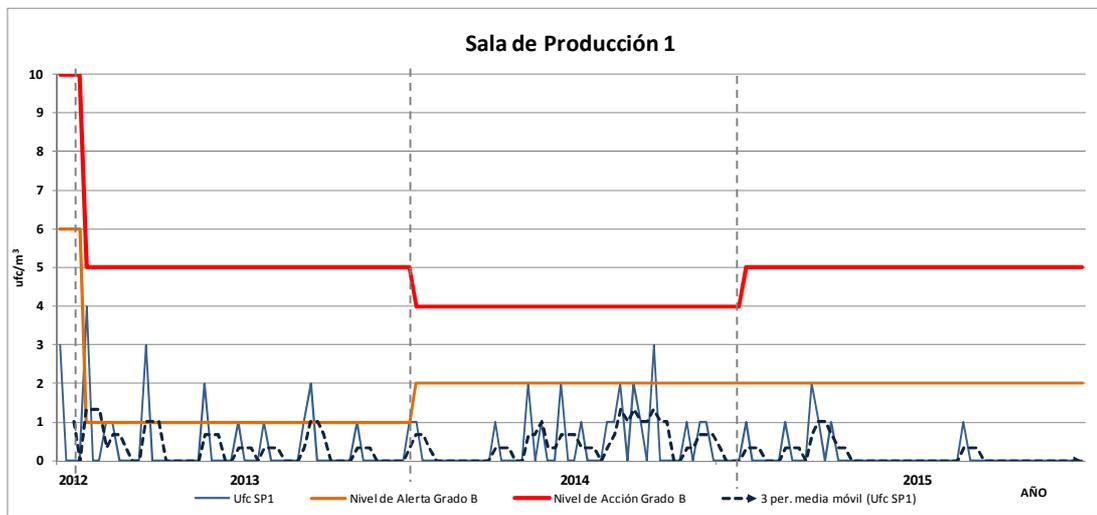


Figura 49. Gráfico de evolución de tendencias en SP1 en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

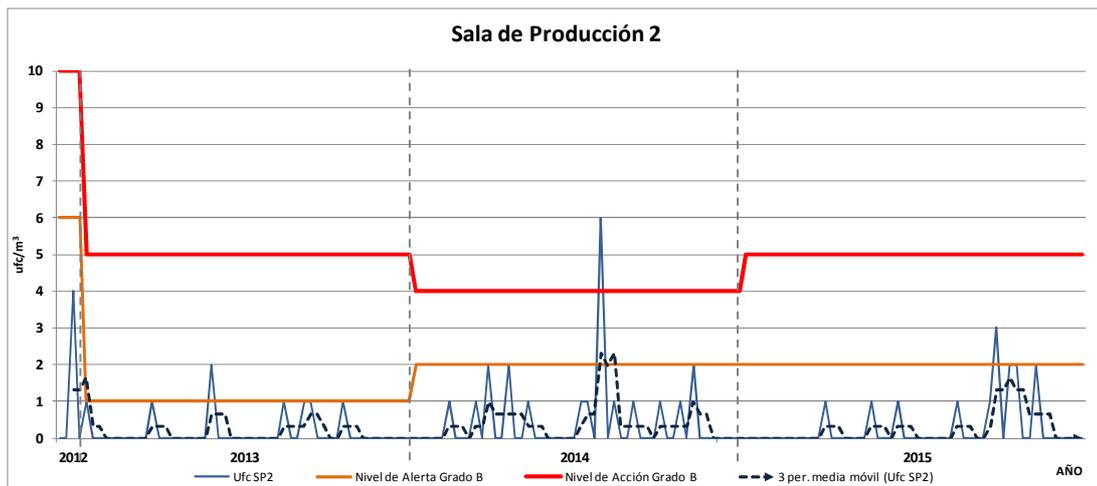


Figura 50. Gráfico de evolución de tendencias en SP2 en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

Resultados

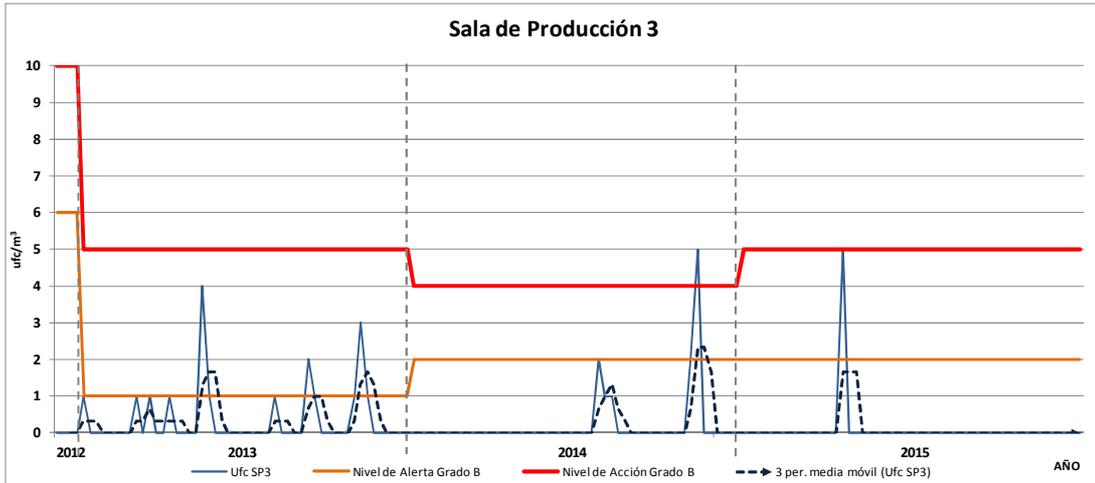


Figura 51. Gráfico de evolución de tendencias en SP3, en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

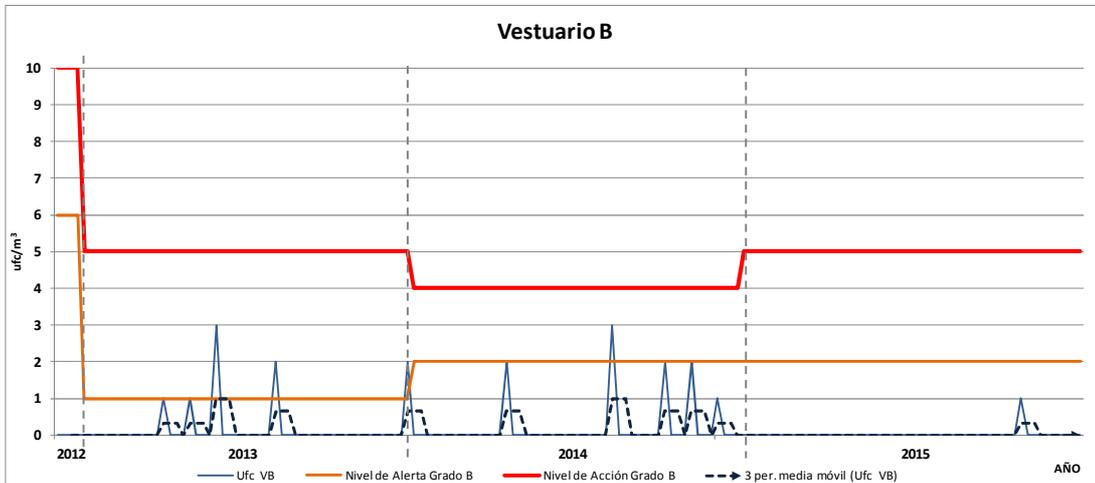


Figura 52. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario B en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

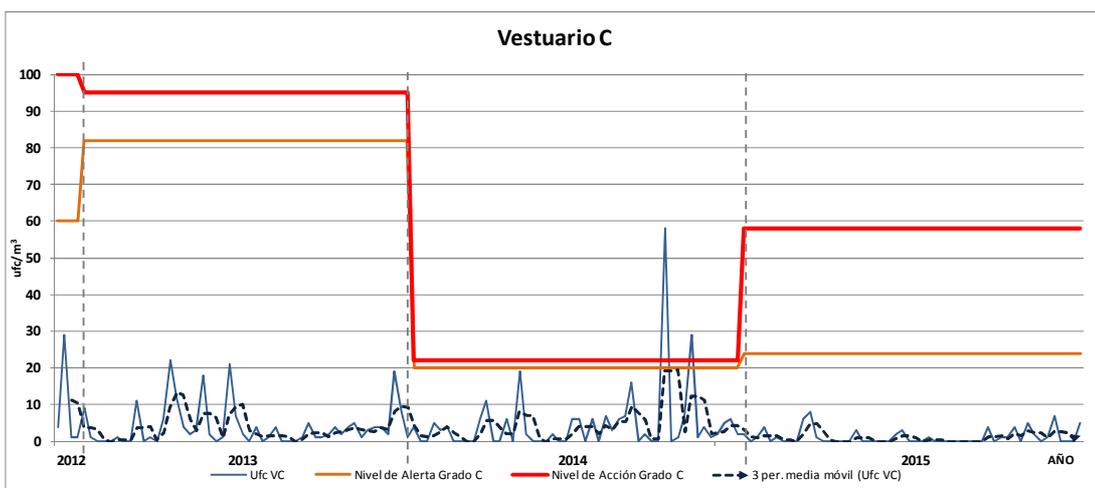


Figura 53. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario C en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

Resultados

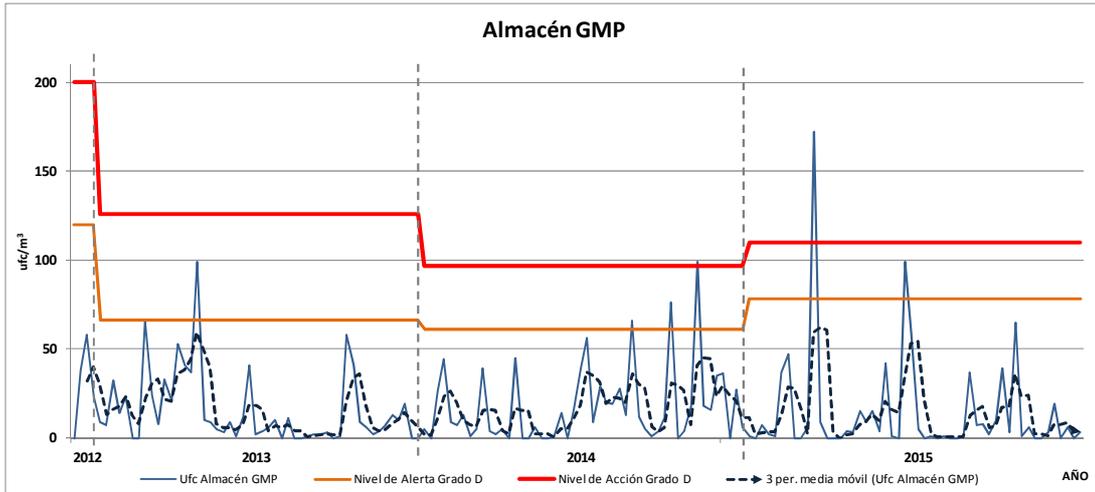


Figura 54. Gráfico de evolución de tendencias en Almacén GMP en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

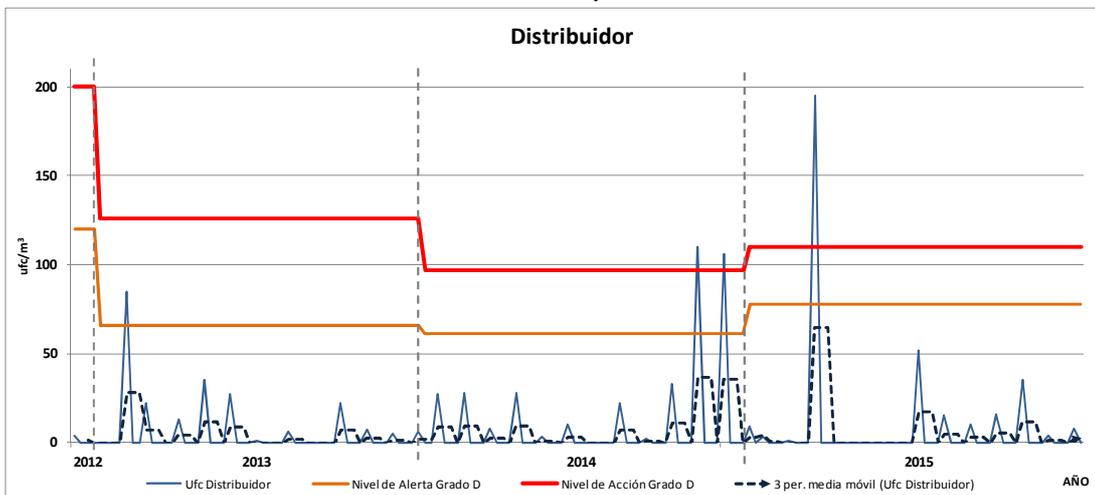


Figura 55. Gráfico de evolución de tendencias en Distribuidor en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

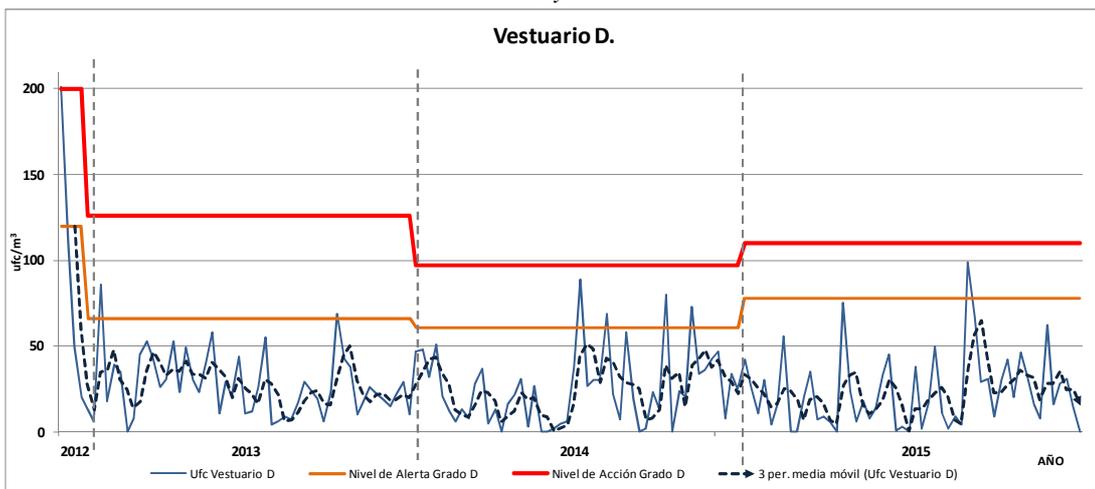


Figura 56. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario D en muestreo volumétrico, con niveles de alerta y acción.

Resultados

Muestreos de superficies

Con los resultados estadísticos obtenidos al final de una anualidad, se establecieron los niveles de alerta y acción para la anualidad siguiente (tabla 86) redondeados a números enteros.

Los datos de 2012 en grado B proporcionaban un P₉₅ con un valor de 0 ufc y un P₉₉ con 1,57 ufc. El establecimiento de niveles de alerta y acción en grado B de 0 ufc y 2 ufc respectivamente carecen de sentido práctico desde el punto de vista microbiológico, por lo que se escogió como nivel de alerta para la anualidad 2013 el P₉₉ (2 ufc), y como nivel de acción, el valor máximo de 2012 (4 ufc) . Para el resto de anualidades, dado que los resultados estadísticos para el P₉₅ eran muy bajos (0 y 1 ufc, respectivamente) se optó por establecer el nivel de alerta en 3 ufc (valor del P₉₉) y el nivel de acción en 5 ufc (valor máximo para grado B según las NCF).

En el caso del establecimiento de los niveles de alerta y acción en grado C, los resultados estadísticos no mostraban valores para el P₉₉ por lo que se optó por establecer como nivel de alerta el valor máximo en cada caso. En el caso del análisis de los resultados de la anualidad 2014, el valor del P₉₅ resultó de 11,95 (12 ufc) y el valor máximo de 13 ufc; dada la escasa significancia microbiológica de ambos valores, se optó por establece el nivel de acción en 16 ufc (de forma que resultaran ligeramente inferiores a los de grado D).

Grados	2012			2013			2014			2015		
	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D
N	542	42	158	777	62	435	763	60	278	748	63	289
Mediana	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	1
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	4	22	42	11	8	32	7	13	32	12	25	38
P ₉₅	0	5,85	13,20	0	4,7	12	0	11,95	10,05	1	9,4	14,5
P ₉₉	1,57	.	39,64	3	.	22	3	.	18,42	7	.	29,3

Grados	Niveles de alerta y acción											
	2013			2014			2015			2016		
	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D
Nivel alerta	2	6	13	3	5	12	3	12	10	3	9	14
Nivel acción	4	22	40	5	8	22	5	16	18	5	25	29

Tabla 86. Resultados estadísticos de los nuestros de superficies para el cálculo de niveles de alerta y acción y valores de establecimiento de los mismos, expresados en número de ufc. En el caso de que el percentil 99 no mostrara resultados (nr) al poseer un número limitado de valores, se seleccionó como nivel de acción el valor máximo de la serie. En la parte inferior de la tabla se muestran los niveles de alerta y acción obtenidos a partir de los datos estadísticos del año anterior.

Resultados

De los 876 muestreos de superficies realizados en grado A en los controles ambientales rutinarios realizados entre 2013 y 2015 ($n=876$), el 99,9 % ($n=875$) mostraron resultados de 0 ufc y el 0,1% restante ($n=1$) de 2 ufc.

En el caso de los muestreos realizados en grado B en el mismo periodo de tiempo ($n=2228$), en el 94,6 % de los casos ($n=2165$) se obtuvieron 0 ufc y en el 3% ($n=68$), 1 ufc.

En grado C, de los 185 muestreos realizados, en el 50,8% ($n=94$) se obtuvo un recuento de 0 ufc y en el 19,5% de los casos ($n=36$), se obtuvo 1 ufc.

Los gráficos de evolución de tendencias para los resultados de los muestreos de superficies en cada una de las salas del área clasificada, junto con los niveles de alerta (naranja) y acción (rojo) establecidos en cada momento se muestran en las figuras 57 a 64.

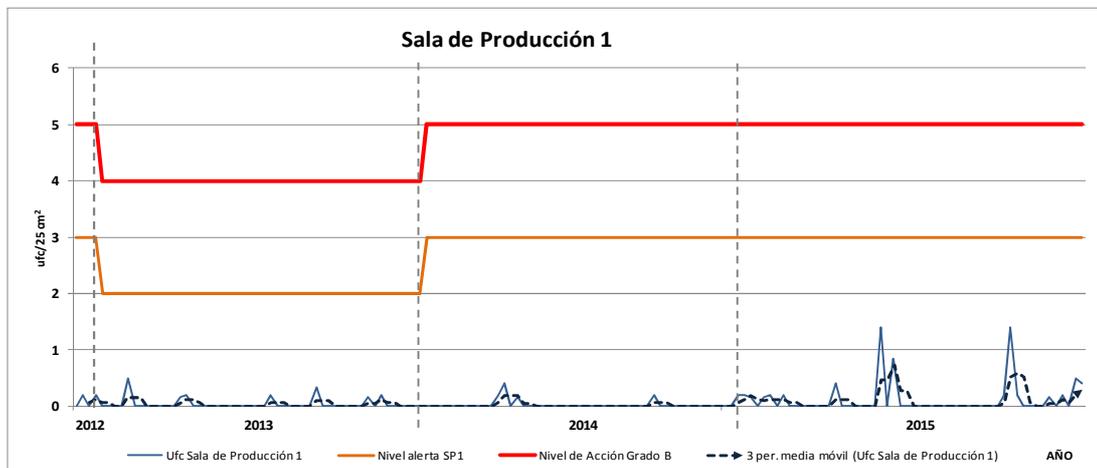


Figura 57. Gráfico de evolución de tendencias en SP1 en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción.

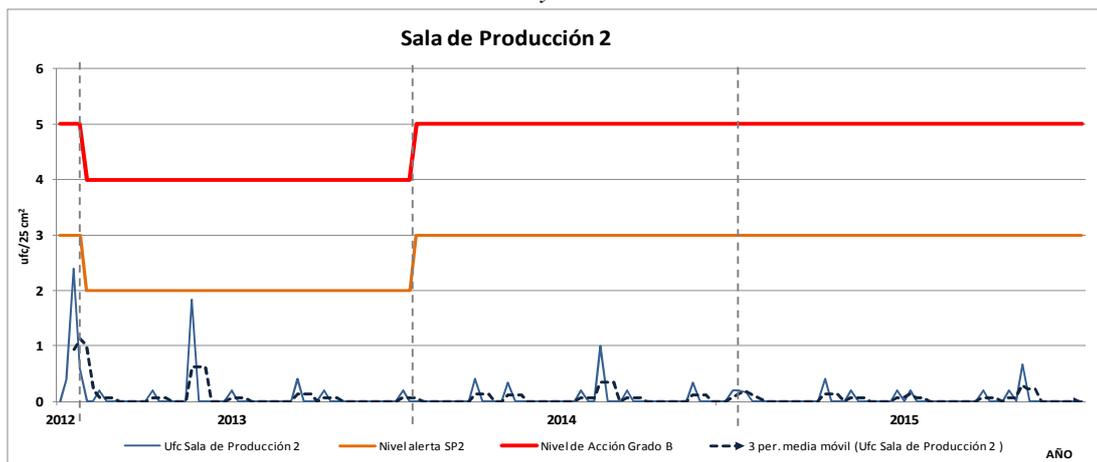


Figura 58. Gráfico de evolución de tendencias en SP2 en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción

Resultados

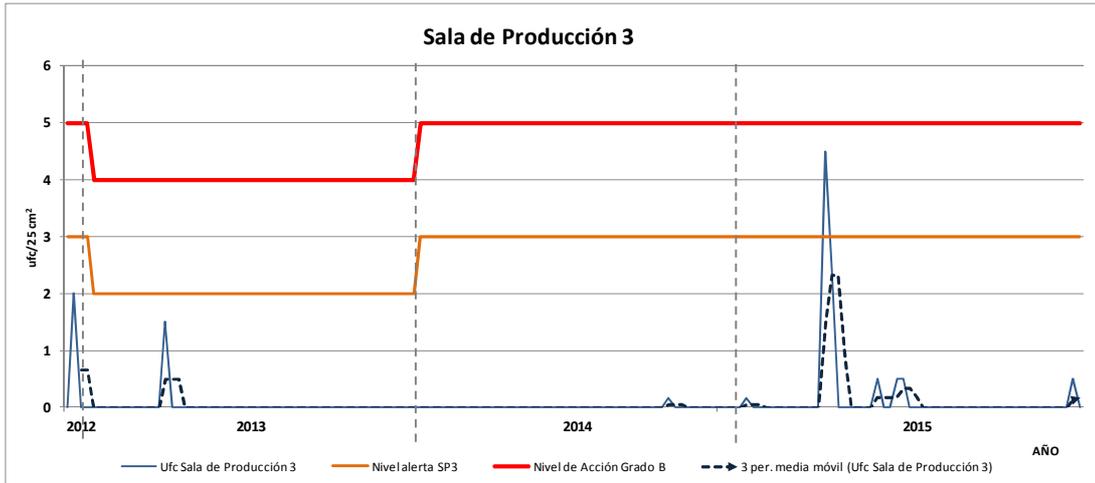


Figura 59. Gráfico de evolución de tendencias en SP3 en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción.

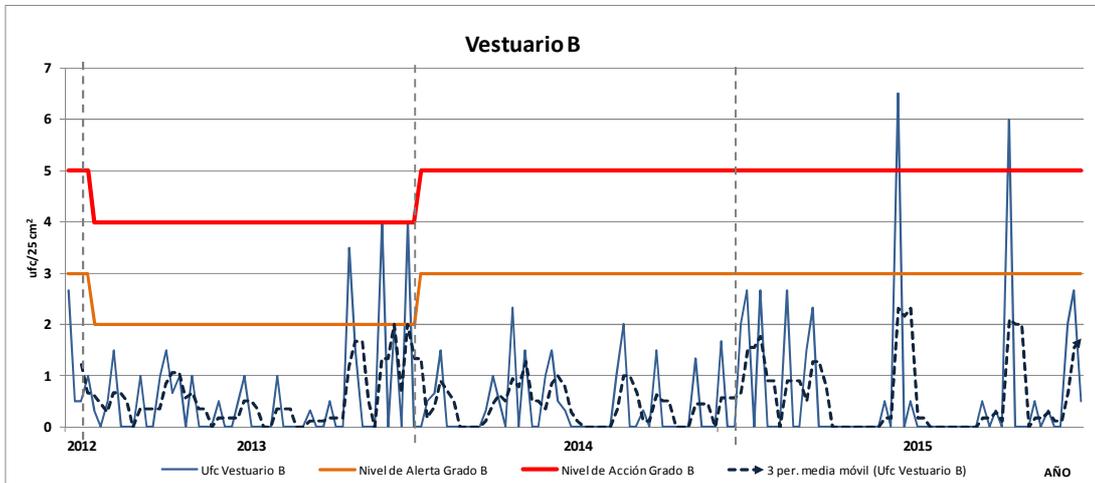


Figura 60. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario B en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción.

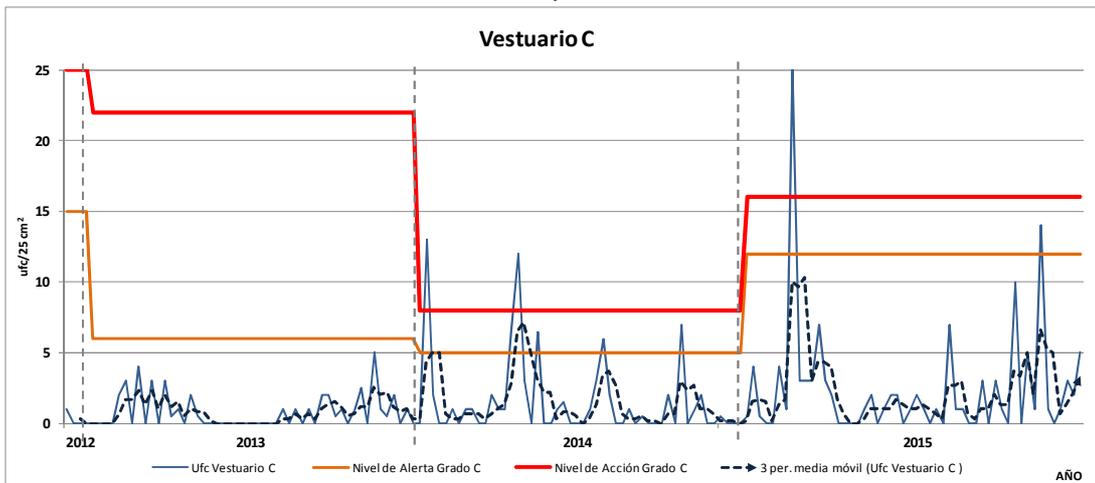


Figura 61. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario C en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción.

Resultados

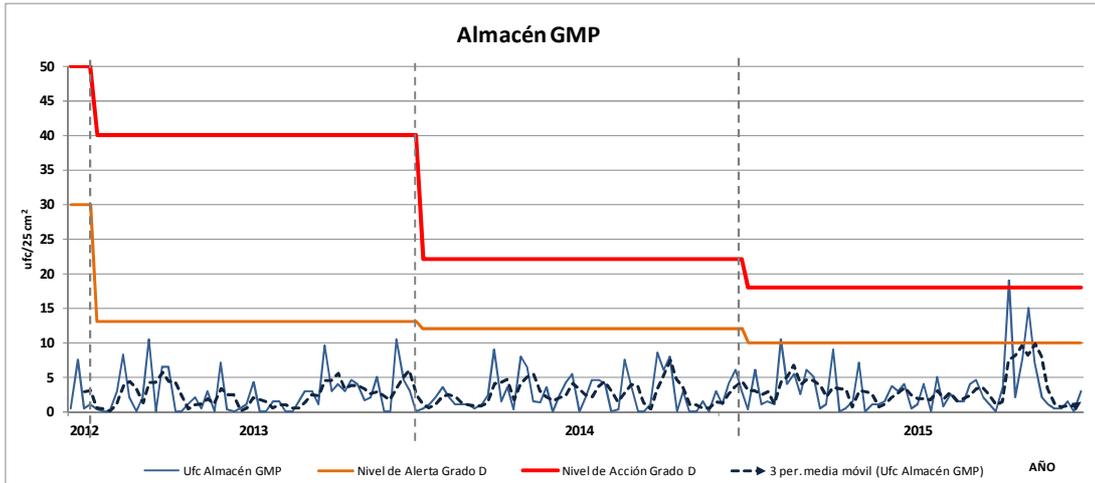


Figura 62. Gráfico de evolución de tendencias en Almacén GMP en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción.

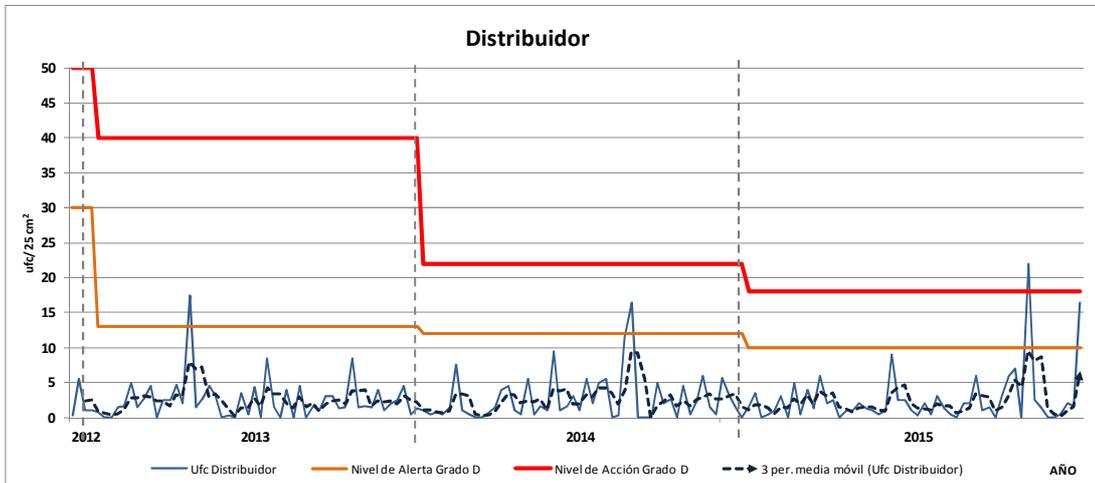


Figura 63. Gráfico de evolución de tendencias en Distribuidor en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción

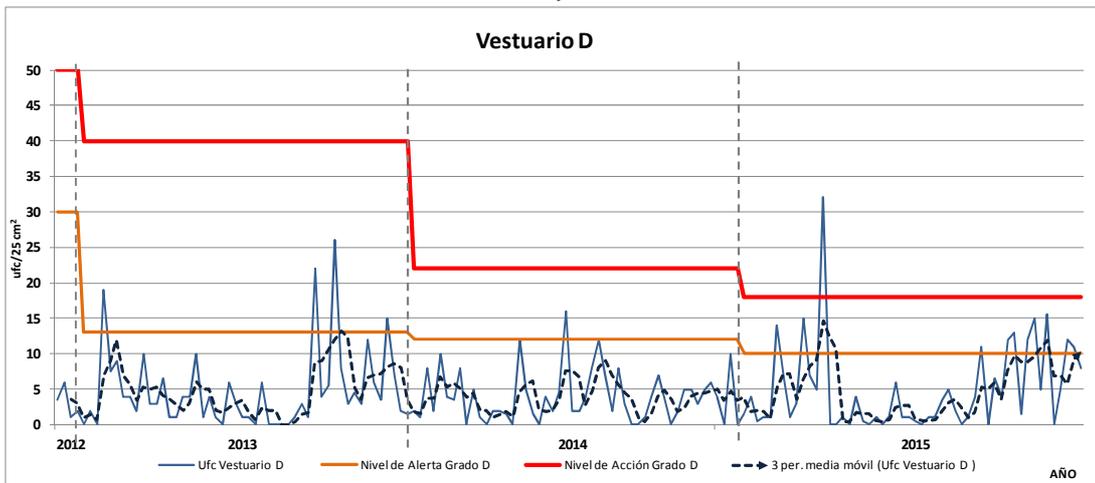


Figura 64. Gráfico de evolución de tendencias en Vestuario D en muestreo de superficies, con niveles de alerta y acción.

Resultados

A la vista de la evolución de tendencias realizada, tanto para los resultados de los muestreos volumétricos como para los de superficies, observamos que a lo largo de toda la serie histórica, los resultados se situaron muy por debajo de los límites establecidos en las NCF para cada grado. Se observan excursiones aisladas que superaron los niveles de alerta o acción establecidos por nosotros ya que estos son mucho más restrictivos que los límites permitidos por las NCF.

Con este análisis y metodología de cálculo de niveles de alerta y acción, durante las anualidades 2014 y 2015, se han obtenido unos valores de alerta y acción que reflejan mejor el nivel de biocontaminación de nuestra instalación, sirviendo para la toma de decisiones en caso de superaciones repetidas de los mismos.

Dado que el nivel de biocontaminación esperado se relaciona directamente con el uso de la instalación (entrada de personal a grado B), y que éste no es uniforme ni constante, se consideró conveniente adaptar estos límites al mismo. Para la realización de actividades de producción, control de calidad y limpieza, el número de entradas anuales en el periodo entre 2012 y 2015 fue de 282, 448, 448 y 502, respectivamente. Los picos de mayor actividad se muestran en la figura 65, donde se puede apreciar que la tendencia de uso de la instalación (regresión lineal) se incrementa con el transcurso del tiempo.

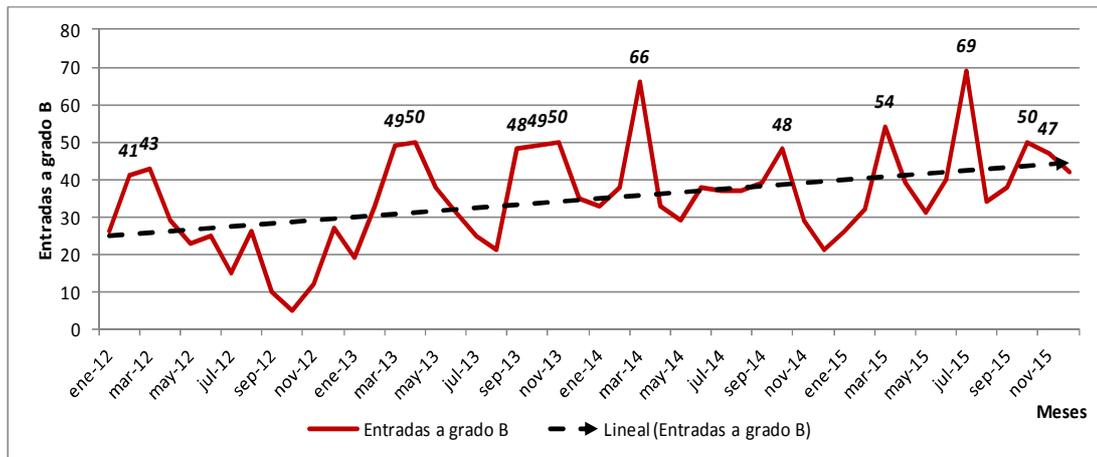


Figura 65. Detalle del número de entradas realizadas a grado B durante los años 2012 a 2015.

Con el fin de intentar relacionar los recuentos en ufc obtenidos en los muestreos de superficies con la actividad de la instalación, se compararon los resultados obtenidos en los Vestuarios B, C y D con el número de entradas realizadas a grado B ya que el acceso a grado B requería de la utilización obligatoria de todos los Vestuarios. Con el fin de poder representar el promedio mensual de ufc en el mismo gráfico que el número de entradas, se multiplicó el número de ufc por un factor de 30 en el caso del Vestuario B (figura 66), de 10 para el Vestuario C (figura 67) y por un factor de 5 en el caso del Vestuario D (figura 68).

Resultados

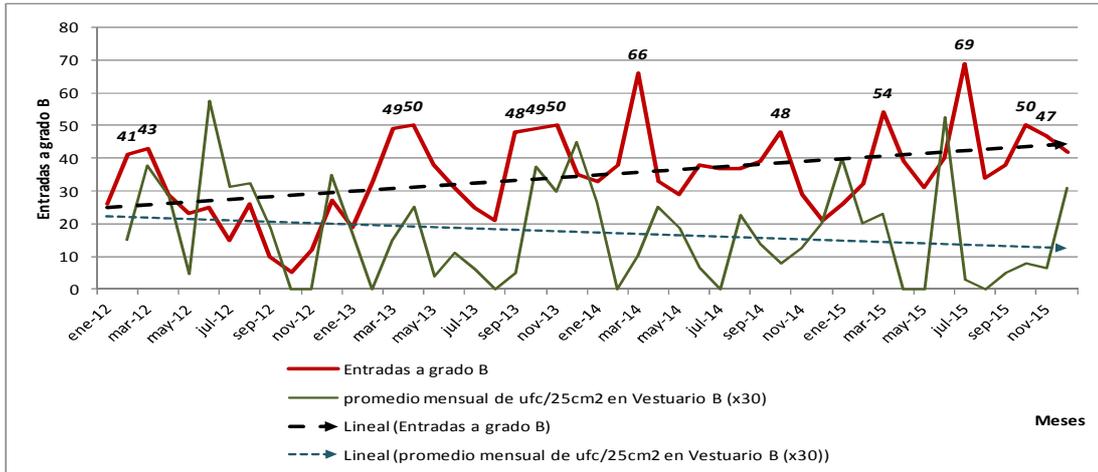


Figura 66. Comparación entre el promedio de ufc recuperadas en el muestreo de superficies en el Vestuario B (x30) y el número de entradas a grado B realizadas. Tendencia lineal de ambas series.

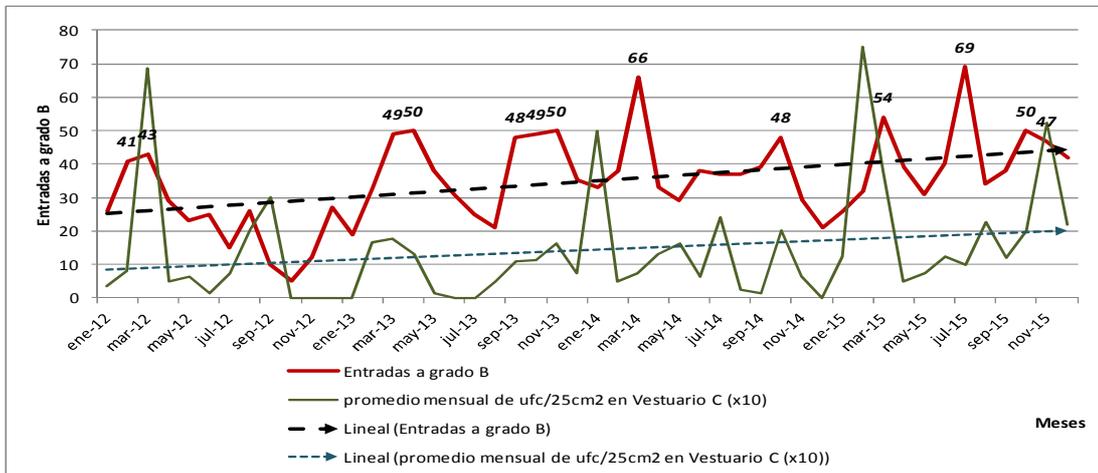


Figura 67. Comparación entre el promedio de ufc recuperadas en el muestreo de superficies en el Vestuario C (x10) y el número de entradas a grado B realizadas. Tendencia lineal de ambas series.

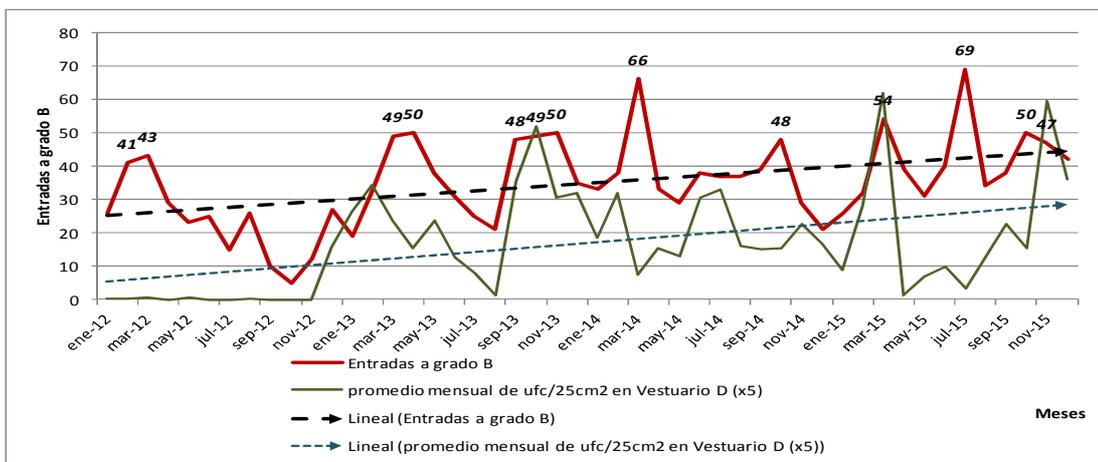


Figura 68. Comparación entre el promedio de ufc recuperadas en el muestreo de superficies en el Vestuario D (x5) y el número de entradas a grado B realizadas. Tendencia lineal de ambas series.

Se puede observar que, mientras que en el Vestuario C y D se ha producido un aumento de la biocontaminación de superficies de forma más o menos proporcional al aumento del número de entradas a grado B, en el caso del Vestuario B la tendencia ha sido la disminución del grado de biocontaminación.

Hasta noviembre de 2012, el popelín se colocaba en grado C y a partir de esa fecha, en el exterior del área clasificada. Hasta noviembre de 2012 las muestras se tomaron al día siguiente de la limpieza y, a partir de entonces, tras aproximadamente 6 días de utilización de la instalación; por lo que el número de entradas hasta noviembre de 2012 tiene una importancia relativa ya que, independientemente de estas, las muestras se tomaron inmediatamente tras la limpieza de la instalación. Este cambio en el procedimiento de vestuario se introdujo al observar, durante la anualidad 2012 que, aunque la sala tenía un bajo número de entradas y las muestras se tomaban tras la limpieza, el nivel de biocontaminación se encontraba relativamente alto (aunque siempre dentro de los límites establecidos por las NCF) y que, en cualquier momento, un período de actividad mayor podría desencadenar una pérdida del control ambiental. La tendencia a la bajada del nivel de biocontaminación en el Vestuario B muestra que las medidas generales de contención implantadas son efectivas para preservar las zonas de grado B.

5.4.1. Análisis de tendencias del muestreo volumétrico por años, en cada sala.

Se analizó el grado de significación entre los resultados obtenidos en los muestreos volumétricos durante todo el período analizado, observando diferencias estadísticamente significativas en grado B: disminución del número de ufc recuperadas en 2015 con respecto a 2014 en la Sala de Producción 1, Vestuario B, Vestuario C y Almacén GMP y un aumento del número de ufc recuperadas en 2013 con respecto a 2012 en el Vestuario D (Fig 69 a 71).

Resultados

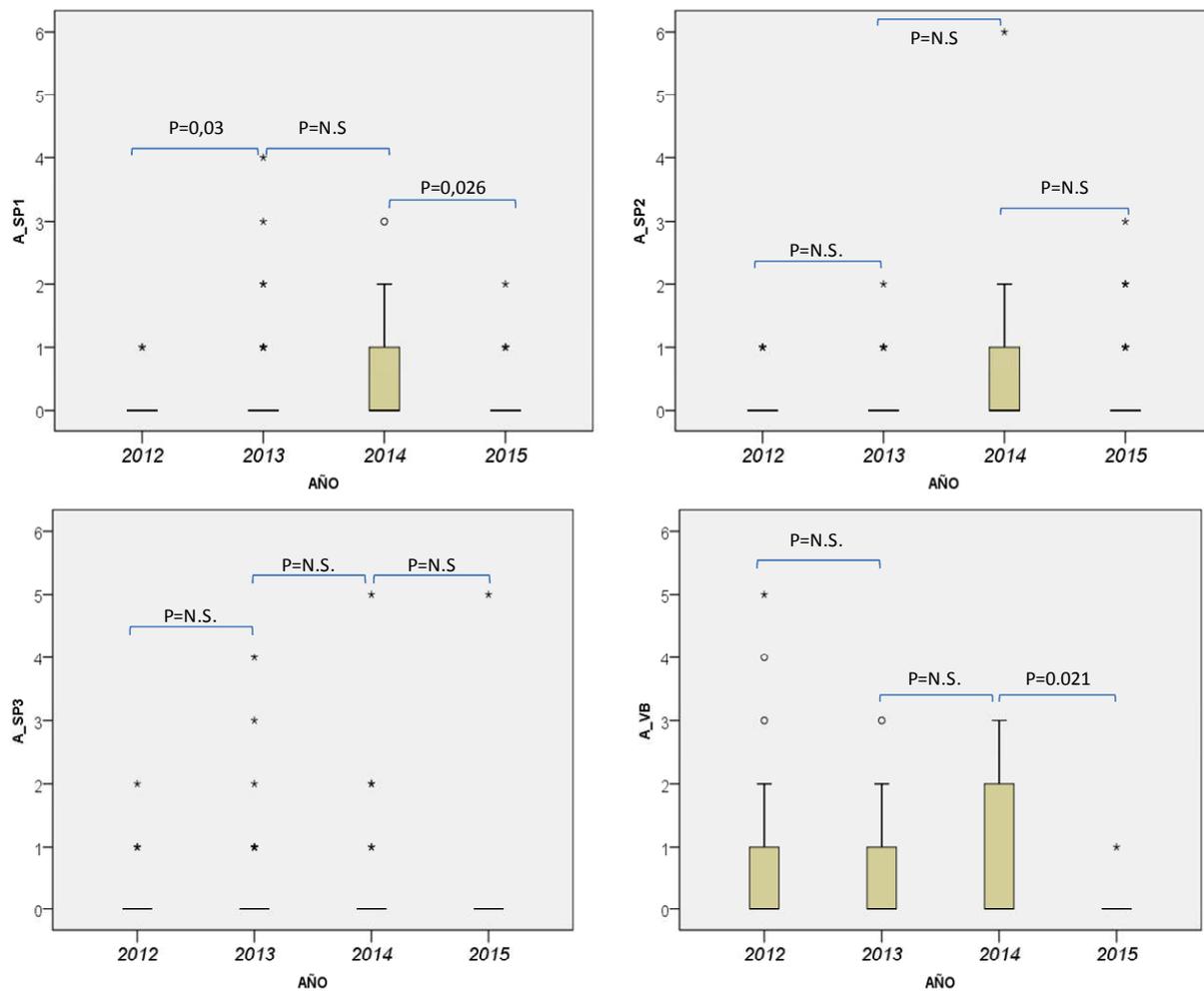


Figura 69. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestras volumétricas, grado B.

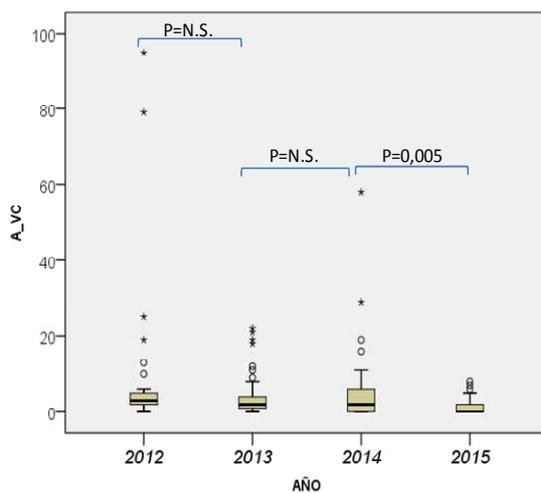


Figura 70. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestras volumétricas, grado C.

Resultados

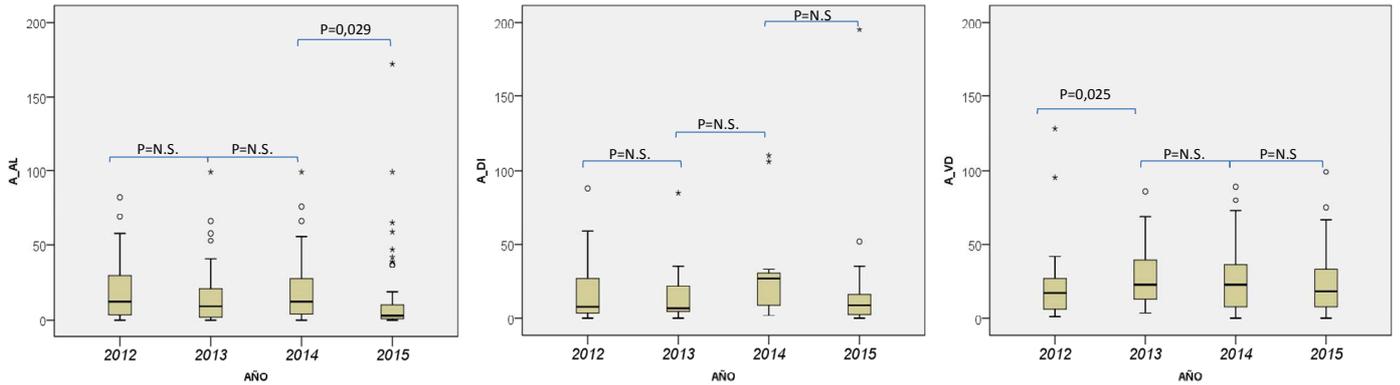


Figura 71. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestras volumétricas, grado D.

5.4.2. Análisis de tendencias del muestreo de superficies (placas de contacto) por años, en cada sala.

Dado que los puntos de muestreo de superficies diferían notablemente entre los controlados durante la evaluación previa de resultados (hasta septiembre de 2012) y los muestreados a partir del año 2013, y con el fin de tener una homogeneidad para contrastar los resultados en un análisis de tendencias, no se incluyeron los resultados del año 2012 para este análisis.

Igual que en el epígrafe anterior, se analizó el grado de significación entre los resultados obtenidos en los muestreos de superficies desde 2013 a 2015, observando diferencias estadísticamente significativas en grado B: aumento del número de ufc recuperadas en 2015 con respecto a 2014 en la Sala de Producción 1, Sala de Producción 3 y Vestuario C (figuras 72 a 74).

Resultados

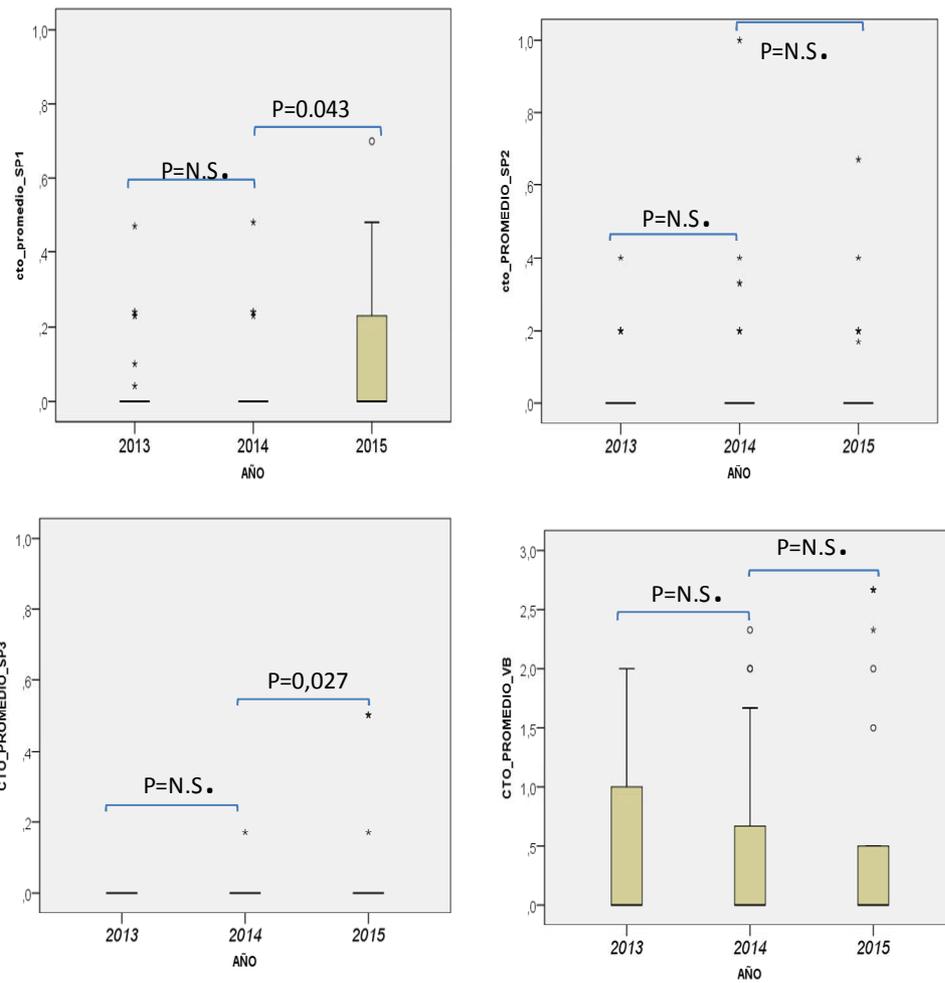


Figura 72. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestréos de superficies, grado B.

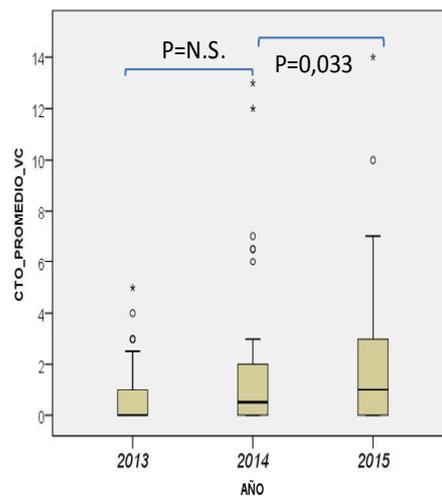


Figura 73. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestréos de superficies, grado C.

Resultados

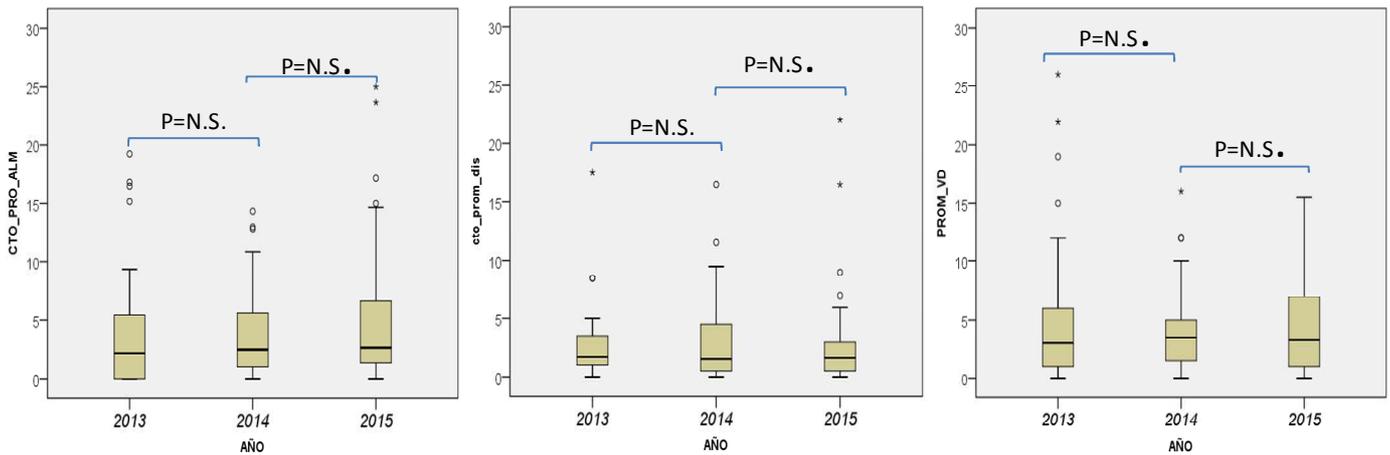


Figura 74. Grado de significación en la evolución de la biocontaminación. Muestras de superficies, grado D.

De los resultados obtenidos podemos concluir que, aunque el nivel de utilización de la instalación ha aumentado en el transcurso del tiempo, la biocontaminación se ha mantenido en unos niveles que quedan muy por debajo de lo admitido por las NCF para cada grado, especialmente teniendo en cuenta que los datos mostrados a partir de enero de 2013 provienen de controles realizados tras 6 días de utilización de la instalación. Por ello, consideramos que los procedimientos de vestuario, entrada y limpieza del área clasificada establecidos en nuestra Unidad son útiles para mantener un adecuado control de la biocontaminación para la fabricación de medicamentos estériles de terapia celular.

Discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6. DISCUSIÓN

En esta tesis se han expuesto las medidas establecidas en la Unidad de Producción Celular del Hospital Regional Universitario de Málaga para implantar un Plan de Control de la Biocontaminación Ambiental que permita asegurar el adecuado mantenimiento de las condiciones señaladas por el Anexo 1 de las NCF para la producción aséptica de medicamentos, adaptándolo al ámbito de las Terapias Avanzadas, teniendo en cuenta las peculiaridades de los procedimientos necesarios para la obtención de medicamentos basados en Células Mesenquimales Troncales Adultas Autólogas derivadas de Tejido Adiposo.

Así mismo, se ha estudiado el papel que juega cada una de las medidas físicas de contención de la biocontaminación ambiental (diseño de la instalación, sistema de ventilación y filtración de partículas HVAC, mantenimiento de cascadas de presión diferencial, renovaciones de aire, etc.); los procedimientos implantados para minimizar la entrada de partículas viables (normas de vestuario y procedimientos de entrada, comportamiento en áreas clasificadas, introducción de materiales y descontaminación de tejidos); y las herramientas para eliminar y remover la biocontaminación generada, ya que, excepto mediante la tecnología de aislador o los emergentes sistemas cerrados, en este tipo de fabricación no es posible suprimir la presencia humana y la contaminación asociada.

Para evaluar adecuadamente el grado de biocontaminación presente en las zonas destinadas a la fabricación aséptica de medicamentos se han de utilizar métodos de muestreo, medios de cultivo y condiciones de incubación que permitan poner de manifiesto la microbiota propia de cada instalación y que reflejen fielmente la contaminación existente. Cuando se realizan análisis microbiológicos de superficies, el método analítico debe validarse para confirmar que los agentes desinfectantes no influyen en la recuperación de microorganismos [120].

La finalidad de la fabricación aséptica de medicamentos es la fabricación productos estériles que no son susceptibles de esterilización terminal y depende en gran parte del control microbiológico de las condiciones ambientales. El propósito del Plan de Control de la Biocontaminación implantado en nuestra Unidad fue documentar el estado de control de la instalación (mediante la medición de partículas viables y no viables) y conocer el grado de calidad ambiental en las instalaciones donde se desarrollaron los procesos de fabricación aséptica (grado A de clasificación ambiental según NCF) y las áreas circundantes (grados de clasificación ambiental B, C y D).

Aún cuando la fabricación se realice en un ambiente controlado y en las condiciones adecuadas, los resultados de los muestreos microbiológicos y de partículas totales son medidas indirectas de la calidad del producto fabricado, por lo que se hace imprescindible realizar un ensayo de esterilidad validado que confirme la calidad del mismo y la consecución del objetivo previsto: fabricación de productos estériles. Las NCF son claras a este respecto: “cuando se lleven a cabo análisis microbiológicos de un producto, el método debe validarse para confirmar que el producto no influye en la recuperación de microorganismos”. Por ello, en este estudio se validó adicionalmente el ensayo de esterilidad descrito en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) 2.6.27 “Microbiological control of cellular products” [113] como alternativa al ensayo de esterilidad clásico.

Según la FDA, el Plan de control de la Biocontaminación es uno de los controles más importantes que se realizan en instalaciones dedicadas a la fabricación aséptica de medicamentos [89]. Cada año, la FDA hace públicas los resultados de las inspecciones realizadas en las conocidas como “Warning Letters” (WL), y el plan de control de la contaminación ambiental es uno de los ítems que más frecuentemente se señalan como deficientes tras las inspecciones realizadas, ocupando la posición 6 del ranking en el año 2015 (el 12,2 % de las WL se refería directamente a deficiencias en el plan de contaminación ambiental) y la posición 5 en el año 2016 (11,3 %).

Idoneidad de los medios de cultivo microbiológicos y métodos de muestreo

Para el control de de la biocontaminación ambiental es preferible la utilización de medios no selectivos, como la caseína de soja digerida, que permitan el crecimiento de un amplio rango de bacterias, hongos y levaduras. Pueden utilizarse otros medios, como el Sabouraud, para el aislamiento de hongos en casos en los que se pretendan aislar específicamente este tipo de microorganismos, u otros tipos de medios en casos en los que se precise o se espere encontrar microorganismos con especiales características de crecimiento [90] [2]. El medio TSA es el más utilizado para el cultivo de microorganismos ambientales ya que es el equivalente al medio de caseína de soja digerida que se describe en las Farmacopeas Americana, Europea y Japonesa [112]. Generalmente no es necesario el muestreo ambiental de microorganismos anaerobios estrictos ya que es improbable que sobrevivan en este tipo de ambientes [90]. Aunque la mayoría de bacterias aisladas en salas blancas son bacterias mesófilas aeróbicas o aerobias facultativas, se pueden encontrar bacterias anaerobias cuando se utilizan algunos tipos de gases y, en ocasiones, asociadas a equipos de liofilización [126]. Existen microorganismos anaerobios en la superficie de la piel humana, principalmente fuente de contaminación en salas blancas: folículos pilosos y glándulas sebáceas representan ambientes anóxicos que albergan

este tipo de microorganismos (ej. *Propionibacterium spp.*) que a menudo son de crecimiento lento y que requieren condiciones especiales para el crecimiento [127]. Generalmente no es necesario el muestreo ambiental de microorganismos anaerobios estrictos en salas de ambiente controlado ya que es improbable que sobrevivan en este tipo de ambientes [90].

En nuestra Unidad, durante la primera etapa de monitorización y puesta a punto de las instalaciones se seleccionó una rutina de cultivo utilizando 2 tipos de medios diferentes: *caseína de soja agar* para la recuperación y aislamiento de bacterias aerobias y aerobias facultativas (TSA3 para los muestreos de aire y CT3P para los muestreos de superficies) y *Sabouraud dextrosa agar* para la recuperación y aislamiento de hongos levaduriformes y miceliares (SN3P para los muestreos de aire y SC3P para las superficies).

Con el fin de verificar que los medios seleccionados, en las condiciones de incubación establecidas, eran capaces de promocionar el crecimiento de microorganismos tipo establecidos en el epígrafe 2.6.12 de la Farmacopea Europea [105], se realizaron ensayos de promoción de crecimiento a los 4 tipos de placas utilizadas. Todos los ensayos de promoción de crecimiento realizados en placas de TSA3 y CT3P mostraron resultados acordes con los criterios de aceptación al realizar los ensayos de promoción de con las cepas bacterianas establecidas en la Ph. Eur. (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*) cuando se incubaron a 30-35°C ≤3 días. Los ensayos de promoción de crecimiento a las placas de Sabouraud dextrosa agar (SN3P y SC3P) mostraron resultados satisfactorios con las cepas tipo de hongos levaduriformes (*Candida albicans*) y miceliares (*Aspergillus brasiliensis/niger*) incubados a 20-25°C ≤5 días. De esta forma se verificó que las placas seleccionadas para realizar los controles ambientales eran capaces de favorecer el crecimiento en las condiciones estándar de cultivo.

El medio de cultivo Sabouraud favorece el crecimiento de hongos frente al de bacterias debido a su pH ácido (5,6) pero no inhibe totalmente el crecimiento de estas ya que, aunque el rango de pH óptimo para el crecimiento de bacterias es de 5 a 9 (óptimo de 7), existen bacterias acidófilas (crecen a pH desde 0 a 5,5), neutrófilas (rango de pH de 5,5 a 8,0) y alcalófilas (pH de 8,5 a 11,5) [128].

En la segunda etapa se suprimió la utilización de medios con Sabouraud dextrosa agar ya que la utilización de un medio para la recuperación de bacterias y otro para la recuperación de hongos supone la recolección del doble de muestras por cada punto de muestreo. Esta decisión no sólo se fundamentó en criterios económicos y de optimización de recursos, sino que además reduce el riesgo de contaminación propio de las actividades de muestreo al reducir el número de placas utilizadas, la cantidad

de actividades y los tiempos de muestreo, en zonas en las que la simple presencia humana es un factor contaminante [112].

Con el fin de implantar el nuevo sistema de monitorización ambiental suprimiendo el uso de las placas de Sabouraud, se realizaron ensayos de promoción de crecimiento a las placas de caseína de soja agar (TSA3 y CT3P) con cepas de *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis/niger*, demostrando que ambas cepas eran capaces de crecer en las placas de TSA3 y CT3P bajo las condiciones establecidas en el epígrafe 2.6.12 de la Ph. Eur. (30-35°C ≤5 días).

Las bacterias normalmente aisladas a partir de los controles ambientales en instalaciones convencionales dedicadas a la fabricación aséptica de medicamentos proceden de la descamación de partículas de la piel humana. Estas bacterias normalmente son residentes saprofitos de la piel y crecen adecuadamente entre los 29 y los 37°C [129]. Por ello, el rango común de temperatura utilizado para recuperar bacterias procedentes de salas blancas se establece entre 30 -35 °C [112]. En cuanto a los hongos, la literatura sugiere que la mayoría de los encontrados en salas blancas tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20-25 °C [130] aunque se ha observado que las especies de *Aspergillus* crecen mejor a temperaturas cercanas a los 30°C [131]. Así por ejemplo, la Farmacopea Americana (USP) sugiere unas temperaturas de incubación dentro del rango de 20-35°C durante al menos 3 días. En el caso de utilizar una sola placa, posibilita la incubación en 2 rangos de temperatura, empezando por la inferior, lo que podría comprometer la recuperación de cocos Gram positivos [90]. A pesar de ello, los criterios no son del todo uniformes y otras guías tales como la norma ISO 14698-1 [2] sugieren un período de incubación total de 2-5 días para bacterias y 5-7 días para hongos, mientras que otros autores [108] prefieren extender el tiempo de incubación a 20-25°C hasta los 5 días.

Con el fin de favorecer el crecimiento de hongos y bacterias, se seleccionó el régimen de incubación a 2 temperaturas diferentes, 20-25°C para favorecer el desarrollo de hongos frente a las bacterias y 30-35°C para poner de manifiesto las bacterias existentes. Aunque el orden de incubación de las placas a una u otra temperatura ha sido motivo de controversia durante mucho tiempo, algunos autores han demostrado que éste no influye significativamente en la recuperación bacteriana pero sí en la recuperación de elementos fúngicos, consiguiendo una mejor recuperación de éstos cuando se incuban las placas primero a 20-25°C y, posteriormente, a 30-35°C [112]. Por ello se seleccionó una pauta de incubación de 20-25°C durante 3 días seguida de una segunda incubación a 30-35 °C durante 2 días más. En nuestra Unidad no se observaron diferencias en las recuperaciones de elementos fúngicos con un período de incubación de 3 días, lo que a su vez acorta el

tiempo de detección de posibles contaminaciones con el fin de implantar las medidas de corrección necesarias con la menor demora posible.

Otro factor a tener en cuenta durante la obtención de muestras ambientales es evitar la deshidratación de las placas utilizadas, que podría mermar las capacidades del medio para hacer crecer a los microorganismos durante la fase posterior de incubación. De esta forma, el anexo 1 de las NCF indica que las placas utilizadas para el muestreo por sedimentación no deben quedar expuestas al ambiente durante más de 4 horas. Varios estudios demuestran que este fenómeno no es tan evidente y que sus efectos sobre la capacidad de recuperación son mínimos [132]. La capacidad de deshidratación de un medio depende de la cantidad de medio (relacionado con la cantidad de agua que posee) y del ambiente al que se expone. El factor ambiental es propio de cada instalación y depende, en gran medida, de la temperatura, humedad y de velocidad del flujo de aire al de la zona a controlar. Se procedió por ello a la comprobación del efecto del aire ambiente de nuestra instalación (grado A) sobre la deshidratación de las placas de TSA3 y a comprobar si mantenían sus capacidades de promoción de crecimiento. El estudio mostró que tras 8 horas de exposición en los muestreos por sedimentación, la posible deshidratación de las placas no afectaba a la posterior recuperación de microorganismos. A pesar de ello y, dado que la cantidad de microorganismos depende directamente del tiempo de exposición y que los valores de referencia establecidos en las NCF son aplicables a placas expuestas durante aproximadamente 4 horas, no se estimó conveniente ampliar el tiempo de exposición durante el desarrollo del plan de biocontaminación ambiental implantado, aunque podrían estudiarse medidas que permitieran la adecuación de estos resultados.

Existe un mayor consenso en cuanto a que los medios de cultivo utilizados para el muestreo de superficies deben poseer agentes neutralizantes que inactiven los restos de desinfectantes que puedan quedar adheridos a las superficies tras su utilización [2] [90]. Las placas utilizadas en nuestra Unidad poseen agentes neutralizantes y, al evaluarlas en condiciones y concentraciones reales de aplicación con los biocidas seleccionados en nuestra instalación, comprobamos que las placas usadas para el muestreo de superficies (CT3P) eran capaces de neutralizar los residuos de los biocidas utilizados y que no se veía mermada su capacidad de promoción de crecimiento.

Respecto a la técnica de muestreo de superficies mediante placas de contacto (RODAC), existen dos variables a tener en cuenta y que pueden afectar la eficiencia de la técnica: la presión ejercida al presentar el medio contra la superficie a muestrear y el tiempo durante el cual el medio es aplicado contra la superficie (tiempo de exposición). Existen equipos en el mercado con la finalidad de unificar el

tiempo de contacto y la presión ejercida en los diferentes muestreos, tratando de homogeneizar el método de muestreo realizado por cada operador. A pesar de ello, la técnica habitual es la realización manual de la técnica realizando una ligera presión que elimine las burbujas que puedan crearse entre el medio de agar y la superficie durante un tiempo determinado.

El efecto de ambas variables sobre la eficiencia de la técnica y la precisión de los resultados no está completamente establecida [124] aunque en algunos estudios se ha comprobado un aumento de la eficiencia conforme aumenta el tiempo de exposición [133], la norma UNE-ISO 18593:2013 indica la idoneidad de usar un tiempo de exposición de 10 segundos [111], mientras que la norma ISO-14698-1 [2] indica que se debe realizar una ligera y estable presión durante unos pocos segundos. Otros estudios realizados indican que incluso la técnica de muestreo mediante placas de contacto, utilizando un tiempo de contacto de 30 segundos, posee una mayor tasa de recuperación de bacterias Gram positivas al compararlo con el muestreo realizado mediante hisopos prehumedecidos [134]. La variabilidad entre los diferentes tipos de placas disponibles en el mercado, el grado de hidratación de éstas, el tipo de microorganismos que se espera aislar (debido en parte a su capacidad de adhesión a las superficies) añadidas a la presión ejercida y el tiempo de contacto hacen, a juicio del autor, necesaria una puesta a punto de la técnica en cada instalación. W Whyte describe dos métodos que pueden ser útiles para este propósito [124].

Ensayo de esterilidad

El clásico ensayo de esterilidad se describe en la Farmacopea Europea (2.6.1), en la Farmacopea Americana (USP <71>), y en la Farmacopea Japonesa (J.P 4.06). El principio del ensayo clásico de esterilidad es una incubación de la muestra en condiciones aerobias a 20-25°C en un medio microbiológico aeróbico y una segunda muestra en condiciones anaeróbicas a 30-35°C en un medio anaeróbico, con un tiempo de incubación de hasta 14 días para ambas muestras y la observación, al finalizar este periodo, de la turbidez del medio. La inoculación de la muestra se puede realizar por filtración o inoculación directa. En el método de inoculación por filtración, la muestra de ensayo se filtra a través de una membrana de 0,45 µm a la que posteriormente se le añade el medio de cultivo. La ventaja de este método es que los productos susceptibles de ser filtrados pueden ser filtrados por completo y por tanto el ensayo es representativo de la totalidad de la muestra; este método no es posible aplicarlo a medicamentos de terapia celular por razones obvias. El método de inoculación directa consiste en añadir la muestra directamente al medio de cultivo, lo que limita la cantidad de muestra y por tanto eleva el error de muestreo [135].

Dado que, en los productos basados en terapia celular, solo es posible tomar una muestra representativa, la Ph. Eur. en su capítulo 2.6.27 permite el uso de técnicas automatizadas una vez que se ha demostrado que poseen una mayor sensibilidad, un mayor rango de detección y son más rápidas [113]. Los equipos automatizados, utilizados para realizar el ensayo de esterilidad, se diseñaron para la detección de microorganismos en sangre y líquidos biológicos (los más comunes son el BacT/Alert de Biormerieux y el BD Bactec FX de Becton Dickinson). Dado que estos métodos de cultivo y los frascos utilizados no están diseñados para ser aplicados a verificación de la esterilidad de productos basados en terapia celular, y a la gran heterogeneidad de los mismos (sangre de cordón umbilical, células madre, médula ósea, linfocitos, plaquetas y células modificadas genéticamente, por ejemplo) se hace necesaria, y así se indica en la Ph. Eur. 2.6.27, una validación del ensayo utilizando la matriz a analizar (en nuestro caso, una suspensión celular de 10^6 CMMTAd/ml en Ringer lactato suplementado con 2,5% de glucosa y 1% de albúmina), con el fin de comprobar que esta no influye en la capacidad de recuperación de microorganismos.

Los resultados de validaciones realizados en un determinado tipo de matriz no son extrapolables a otros productos de terapia celular acondicionados en otros tipos de matrices [136]. A pesar de ello, Khuu y cols. [137] mostraron que el medio en el que se resuspende un determinado tipo celular no tiene efectos en la detección de microorganismos salvo que contenga sustancias antibióticas.

El ensayo de esterilidad mediante este tipo de equipos no soluciona el error clásico de muestreo ya que las elevadas condiciones de asepsia donde se preparan este tipo de productos de terapia celular hacen que el número de contaminantes sea inicialmente muy bajo. Sin embargo, esto no descarta que puedan multiplicarse durante posteriores etapas de almacenamiento y transporte, con la consiguiente posibilidad de causar infecciones severas. Si existe un pequeño número de microorganismos en el producto a ensayar, puede ocurrir que la muestra tomada resulte estéril mientras que el producto en su conjunto no lo sea. Por ello, este tipo de ensayos sólo puede asegurar la ausencia de crecimiento en la muestra analizada, pero no que el producto fabricado sea estéril [135]. A pesar de ello, los productos basados en terapia celular poseen una vida media muy corta (en nuestro caso el producto se infunde al paciente dentro de las 16 horas posteriores a su fabricación) y se almacenan desde el momento de su envasado hasta su posterior infusión a temperatura inferior a 20 °C (habitualmente entre 2 y 15 °C); ambos factores limitan la capacidad de promoción de crecimiento de posibles contaminantes.

En la validación del método utilizado se comprobó que nuestra matriz no interfería con el ensayo de esterilidad, logrando una sensibilidad en la detección de hasta 5 ufc de los microorganismos establecidos en la Ph. Eur. Durante la comprobación de la

reproducibilidad del ensayo, en la que se compararon la efectividad de los 2 tipos de frascos aeróbicos disponibles (Plus Aerobic/F y Peds Plus /F) se observó que el frasco Peds Plus/F poseía mayor capacidad de recuperación. Esto, junto al hecho de que está diseñado para trabajar con volúmenes de muestra inferiores (1-3 ml de muestra) lo hacen de elección para la detección de microorganismos aerobios y aerobios facultativos (incluyendo hongos levaduriformes y miceliares) procedentes de productos de terapia celular y, usado en combinación con el frasco Lytic Anaerobic/F para la detección de anaerobios estrictos, constituyen la pareja ideal de medios para realizar el ensayo de esterilidad 2.6.27 cuando se utiliza el sistema Bactec FX.

Estos resultados concuerdan con estudios previos [136] [137], aunque en ellos no se utilizaron los frascos Peds Plus/F. Hocquet y cols. [136] comprobaron que la combinación de los frascos Plus Aerobic/F y Lytic Anaerobic/F era capaz de promover el crecimiento de 10 tipos bacterianos diferentes (tanto patógenos como saprofitos de la piel humana), 4 tipos de hongos levaduriformes y 3 de los 4 hongos miceliares testados, todos ellos a concentraciones de 10 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc). El uso de un frasco adicional para el crecimiento específico de hongos (MycosisTM IC/F Culture vials, BD BactecTM), logró detectar los cuatro tipos de hongos miceliares y la prolongación del tiempo de incubación de 7 a 10 días, logró detectar una cepa de *Propionibacterium acnes* con un inóculo de 10 ufc. Ambos hallazgos representaron un porcentaje muy escaso de contribución en el ensayo de esterilidad de productos de terapia celular.

En lo relativo a los tiempos de detección, los resultados obtenidos en nuestra Unidad con los frascos Peds Plus/F y Plus Aerobic/F inoculados con 5 ufc fueron muy similares a los obtenidos por Hocquet y cols. en los frascos Plus Aerobic/F con un inóculo de 10 ufc para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* y *Aspergillus*, pero muy diferentes en el tiempo de detección para *Candida albicans* (27,7 horas en sus frascos Plus Aerobic/F frente a las 153,65 h en los frascos Peds Plus/F y 108,9 h en los frascos Plus Aerobic/F obtenidos en nuestra Unidad). Sin embargo, estos mismos autores presentan periodos de detección muy similares a los de *Candida albicans* de nuestra Unidad a la hora de detectar la cepa de *Candida glabrata* (139,4 h).

Por último es de destacar que, cuando se utilicen matrices que contengan antibióticos, se debe comprobar el efecto bacteriostático y fungistático que estos ejercen, a pesar de que los frascos de cultivo contengan sustancias capaces de capturar y neutralizar los antibióticos [137]. A juicio del autor, una de las mayores limitaciones de la técnica, además de la cantidad de muestra inoculada, reside en la cantidad de antibiótico en la muestra inoculada (principalmente procedentes de

etapas intermedias del proceso de fabricación) ya que las elevadas concentraciones de antibiótico presentes en los medios de cultivo celular pueden superar fácilmente la capacidad neutralizante de los frascos utilizados haciendo ineficaz el método de cultivo.

Diseño e implantación de procedimientos de aseptización y limpieza

La cuidadosa elección de los desinfectantes utilizados, así como la adecuada desinfección y limpieza de las instalaciones donde se llevan a cabo la fabricación aseptica de medicamentos estériles es crucial para lograr el medio ambiente necesario para asegurar la calidad del proceso de fabricación. En muchas ocasiones, la seguridad microbiológica de estos productos se evalúa por la integridad del proceso de fabricación, por el grado de biocontaminación ambiental y por los procedimientos de limpieza y desinfección implantados en la instalación. Tanto es así, que la FDA y la EMA, a través de las correspondientes NCF, obligan a la validación de los procedimientos de limpieza y desinfección implantados en cada Unidad, así como al aseguramiento de que los desinfectantes utilizados son estériles al ser utilizados y no suponen en sí mismos una fuente de contaminación [39] [89].

La idoneidad, eficacia y limitaciones de los agentes desinfectantes y procedimientos utilizados han de ser evaluados y su efectividad debe medirse por su capacidad para asegurar que los potenciales contaminantes son adecuadamente eliminados de las superficies [89].

Tanto la cualificación de los desinfectantes utilizados como con la validación del proceso de limpieza y desinfección están sometidos a estrecha vigilancia por parte de las agencias reguladoras (en nuestro caso la AEMPS) y son objeto prioritario de revisión durante las inspecciones que realizan estos organismos.

La validación de los agentes desinfectantes utilizados en cada instalación se hace necesaria ya que los desinfectantes comerciales han sido ensayados frente a microorganismos y superficies estandarizadas, requeridas para su registro, que pueden coincidir o no con las superficies que en cada instalación se pretenden desinfectar. Así, por ejemplo, para utilizar una sustancia como desinfectante en los Estados Unidos, estos han de ser registrados y aprobados por la Environmental Protection Agency (EPA) y los ensayos que se requieren han de realizarse utilizando microorganismos tipo (habitualmente *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) en una única superficie habitualmente acero inoxidable o cristal. En España, el Registro Oficial de Plaguicidas de uso ambiental y en la industria alimentaria está regulado por el Real Decreto 3349/1983 [138] y sus modificaciones [139] [140], y constituyen el marco normativo básico por el que se regulan los plaguicidas hasta la aplicación total de la Directiva 98/8/CE.

El Real Decreto 3349/1983 establece las normas de referencia para evaluar una sustancia como bactericida, fungicida y esporicida tanto en suspensión [115] [116] [118], como en superficies no porosas [119] [141]. Para registrar un producto con actividad bactericida y fungicida para ser utilizado en la desinfección de superficies, los microorganismos que han de ser evaluados son *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hiriae*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* y la superficie exigida para su verificación es acero inoxidable. Las bacterias tipo exigidas en la norma distan de ser las habituales de las instalaciones dedicadas a la fabricación aséptica de medicamentos y las superficies suelen ser más heterogéneas.

Por ello, se realizaron las pruebas de validación de los desinfectantes con el fin de escoger los que mejor se adaptaban a las necesidades de la Unidad, incluyendo en las mismas el microorganismo aislado con mayor frecuencia en las monitorizaciones ambientales de nuestra instalación (*Micrococcus luteus*). En cuanto a las pruebas en suspensión realizadas a los biocidas esporicidas, se observó que tras un tiempo de exposición de 5 minutos, el biocida AQ (Amonio Cuaternario) fue el que mayor eficacia bactericida, fungicida y esporicida presentó seguido del biocida PH (Peróxido de Hidrógeno); el biocida AH (Ácido Hipocloroso) presentó rendimientos notablemente inferiores. En cuanto al ensayo sobre superficies, de nuevo, el biocida AH presentó rendimientos inferiores (frente a las esporas de *Bacillus subtilis*). De los dos biocidas no esporicidas ensayados (etanol e isopropanol, ambos al 70%) se comprobó que el alcohol isopropílico tenía una eficacia fungicida ligeramente mayor, pero resultaba más irritante para el personal de limpieza cuando se utilizaba sobre grandes superficies durante los aclarados de los biocidas esporicidas. En vista de estos resultados se optó por la combinación de los biocidas esporicidas AQ y PH en los procedimientos de limpieza y desinfección, para ser utilizados mensualmente en rotación, tal como establecen las NCF y se mantuvieron ambos alcoholes al 70% para su utilización como biocidas no esporicidas, en función de la superficie a desinfectar. El biocida AQ posee la desventaja de ser corrosivo, por lo que necesita ser aclarado. El biocida PH cuenta con la ventaja adicional de poseer actividad virucida.

A pesar de estos resultados, todos los biocidas analizados se adquieren comercialmente “listos para su uso” y no son diluidos en nuestras instalaciones, por lo que a las concentraciones usadas en condiciones reales (1/1), todos son eficaces para eliminar concentraciones de microorganismos de 5 órdenes de magnitud superiores a las que pueden encontrarse en este tipo de instalaciones. Además, los biocidas AQ y PH aplicados en los procedimientos de desinfección de nuestra instalación se dejan actuar durante aproximadamente 60 minutos, tras lo cual son

aclarados con alcohol 70% para eliminar los residuos y prologar la vida útil de superficies de trabajo, equipos y superficies de la instalación.

A pesar de que se ha descrito la aparición de resistencias a biocidas [142] [143], Sutton ha publicado un capítulo de un libro en el que se sugiere que no existen evidencias científicas que avalen la posibilidad de aparición de resistencias bacterianas (de forma análoga a las resistencias mediadas por antibióticos) en zonas de ambiente controlado [144]. A pesar de ello, tal y como sugiere la AEMPS, se implantó el sistema rotacional entre los biocidas AQ y PH.

Se verificó la esterilidad de los biocidas en condiciones reales de aplicación, extendiendo su vida útil a 3 meses desde su apertura en introducción en los ciclos de limpieza. Dado que los materiales de diferentes salas no deben intercambiarse con el fin de evitar la contaminación cruzada, los biocidas esporicidas que al final de su periodo rotacional de 1 mes no se han consumido, son almacenados para ser introducidos de nuevo en el ciclo rotacional siguiente. De esta forma se ha conseguido una considerable reducción de los costes de los desinfectantes utilizados.

La validación del procedimiento de desinfección realizado en nuestra instalación demostró que los procedimientos de limpieza implantados y los medios utilizados para la aplicación de los biocidas, eran capaces de eliminar la posible contaminación ocasionada. A pesar de ello, una adecuada validación del procedimiento de desinfección no ha de cernirse exclusivamente a la consecución de 3 ciclos satisfactorios de limpieza-control sino que debe demostrarse mediante un plan de monitorización ambiental de forma continuada. Por ello, durante la primera etapa de control y recopilación de información los controles ambientales se realizaron al día siguiente de la limpieza de las instalaciones.

La principal labor del personal de nuestra Unidad fue la formación de los operarios de limpieza que habitualmente desarrollan su actividad en las zonas comunes del Hospital y que hasta ese momento desconocían por completo las peculiaridades de una instalación de este tipo, ya que podían ser una importante fuente de entrada de biocontaminación a la instalación. Se realizaron varios programas de formación teórica y práctica sobre los procesos de vestimenta y métodos de limpieza en salas de ambiente controlado consiguiendo finalmente encontrar una plantilla comprometida. Se estableció que el personal de limpieza no realizaría labores propias de su puesto en ningún lugar del Hospital el día que se realizaban las limpiezas de nuestra instalación con el fin de minimizar los riesgos de introducir gérmenes patógenos en nuestra instalación.

Identificación de los puntos críticos de riesgo de biocontaminación ambiental

Durante la primera etapa de control de la biocontaminación (hasta septiembre de 2012) se pusieron a punto los procesos de fabricación y se realizó la validación del proceso de fabricación aséptica de medicamentos basados en CMMTAd autólogas.

Del análisis de los resultados obtenidos de los recuentos de *partículas totales* desde octubre de 2012 a diciembre de 2015 en grado A “en funcionamiento”, se observó que el 83,7% de los recuentos de partículas de diámetro superior a 0,5 μm mostraban resultados de 0 partículas y el 94,7% de los recuentos de partículas diámetro superior a 5 μm también resultaron de 0 partículas. Durante las actividades de cualificación de la instalación los recuentos de partículas totales obtenidos en grado A “en reposo” fueron 0 para ambos tipos de tamaños de partículas. Los muestreos volumétricos de aire de partículas viables en grado A hasta septiembre de 2012 (n=195), tan sólo mostraron el crecimiento de 1 ufc y los controles mediante placas de sedimentación (n=195) no revelaron el crecimiento de ningún microorganismo.

Dado que las cabinas de flujo laminar se encuentran ubicadas en entorno de grado B, son cualificadas con periodicidad semestral y poseen alarmas de velocidad de aire de impulsión, es extremadamente improbable detectar contaminaciones por partículas viables en zonas de grado A “en reposo”, incluso algunos autores sugieren que la relación entre partículas no viables y viables puede establecerse aproximadamente de 1500:1 [145]. Las labores de muestreo en sí mismas suponen una fuente adicional de contaminación, siendo este el origen más probable de la ufc aislada. Tras un análisis exhaustivo de estos resultados se decidió suprimir los muestreos volumétricos de aire (muestreo activo) y de sedimentación de partículas (muestreo pasivo) en las zonas de grado A “en reposo”.

Mientras que los muestreos volumétricos de aire miden el número de microorganismos presentes en un volumen determinado de aire (habitualmente 1 m^3), los muestreos ambientales realizados mediante la sedimentación de partículas viables miden el número de microorganismos suspendidos en el aire y que se depositan sobre una superficie en un determinado periodo de tiempo. La primera medida supone una estimación indirecta de la probabilidad de contaminación de un producto mientras que la segunda puede utilizarse como medida directa de esta probabilidad [146]. Por tanto, para calcular la probabilidad de contaminación de un producto de terapia celular expuesto en un ambiente de grado A, se ha de medir la contaminación mediante el muestreo con placas de sedimentación en el mismo ambiente y en el mismo tiempo que se manipula el producto (grado A). El control mediante placas de sedimentación en grados diferentes (grados B, C y D), aún en el mismo periodo

temporal, al de la exposición del producto pierde su utilidad a la hora de calcular el riesgo de contaminación del producto expuesto en grado A.

Dado que los microorganismos suspendidos en el aire en este tipo de instalaciones provienen (salvo deficiencias en el sistema HVAC) de la descamación de partículas de la piel humana [147] [43], [47], [51], [55], [148]–[150], que viajan normalmente adheridas a estas [151], que su velocidad de deposición sobre las superficies varía dependiendo del tamaño de la partícula siendo el promedio de 0,46 cm/s [152] y al hecho de que estas instalaciones poseen un número elevado de renovaciones de aire por hora (en nuestra instalación, 60 renovaciones por hora en zonas de grado B y C, y 30 en las zonas de grado D); es de esperar que las partículas viables obtenidas en los controles de sedimentación (ufc) correspondan a las partículas proyectadas por el personal que realiza las labores de control de contaminación o ha realizado actividades en la zona muestreada momentos antes del control. Por ello, el control rutinario ambiental realizado en una instalación “en reposo” mediante placas de sedimentación probablemente sólo ponga de manifiesto la contaminación generada por el propio personal que realiza las labores de control. Tras un análisis pormenorizado de los resultados, se consideró irrelevante el control ambiental rutinario (semanal y mensual) mediante este tipo de muestreo en las zonas de grado B, C y D por lo que fue suprimido a partir del análisis de riesgos realizado. Aún así, se decidió incluirlo como parte de los controles realizados en las cualificaciones microbiológicas (semestrales y anuales). Como es normativo, el control ambiental mediante placas de sedimentación se mantuvo como parte de la monitorización de las actividades de riesgo realizadas en grado A.

En cuanto a los controles de superficies mediante placas de contacto, para evitar la contaminación generada por el propio proceso de muestreo y dado que todas las cabinas de flujo laminar se someten a ciclos de descontaminación UV tras cada utilización, se redujeron aunque no se suprimieron totalmente los puntos de control en grado A “en reposo”. En total, en los muestreos semanales se redujeron de 10 a 5 los puntos muestreados en grado A, y de 24 a 14 los muestreos en grado B, mientras que se mantuvieron los mismos en grado C y se aumentaron en 1 punto en grado D (carro situado en el Distribuidor). En los muestreos mensuales, se mantuvieron los controles realizados en grado A, se redujeron de 19 a 4 los realizados en grado B, de 3 a 1 los realizados en grado C y de 7 a 4 los realizados en grado D. Esta disminución en los puntos de muestreo supuso un importante ahorro económico.

Como medida alternativa a esta disminución en los puntos de muestreo se implantó un régimen de cualificaciones microbiológicas semestrales en los grados A y B y anuales en los grados C y D, a semejanza de periodicidad de la cualificación del sistema HVAC definida en la norma ISO 14644-2. La implantación de esta medida,

que supone un estricto control de las diferentes salas mediante los muestreos volumétricos de aire, sedimentación de partículas y superficies de contacto, permite establecer con precisión el grado de contaminación de la instalación y detectar puntos de control que en su caso deban añadirse a los controles periódicos realizados. El control de la efectividad de las lámparas UV durante las cualificaciones microbiológicas permite detectar una disminución de su efectividad y prever su reemplazo.

De los resultados de los controles realizados al baño termostatzado, se comprobó que es una importante fuente de contaminación y que su utilización para la descongelación de medios y suspensiones celulares, que posteriormente van a ser introducidos en el área clasificada, supone un elevado riesgo de biocontaminación del área clasificada. Como medida preventiva implantada desde su puesta en marcha se optó por introducir los productos a descongelar en bolsas herméticas adicionales, que tras el proceso de descongelación eran inmediatamente retiradas antes de introducir los productos en el área clasificada. La adición del desinfectante Virkon al agua eliminó por completo las contaminaciones del baño aunque, en opinión del autor, estos procedimientos de descongelación usando baños termostatzados deberían evitarse si no son estrictamente necesarios.

Las medidas implantadas para evitar la contaminación del agua de los incubadores usados para los cultivos celulares, control de contaminación semanal y renovación del agua (estéril) con periodicidad mensual, además se mostraron adecuadas para prevenir la contaminación de los mismos. En este sentido, como medida de precaución adicional se estimó conveniente introducir en los procedimientos de fabricación la no apertura prolongada de la puerta de los mismos ya que quedan expuestos a un ambiente en el que, durante las actividades de fabricación, puede contener partículas viables en suspensión (grado B). La contaminación descrita justo tras las actividades de cualificación de los mismos sugiere que estas actividades han de ser realizadas por personal cualificado de empresas de reconocido prestigio y experiencia en este tipo de instalaciones, han de ser supervisadas por el personal de la Unidad y los instrumentos de medida utilizados han de ser minuciosamente asepsados. En nuestra experiencia, la adquisición de equipos equipados con un sistema de doble puerta (una de ellas habitualmente de cristal) y con capacidad de realizar ciclos de descontaminación (pirolíticos), reduce el riesgo de contaminación y facilita su descontaminación, en caso necesario.

Los controles de esterilidad realizados a los tejidos adiposos mostraron que habitualmente se encuentran contaminados a pesar de que su extracción se realizó en quirófanos utilizados para cirugías convencionales y clasificados según la norma UNE 17340 [153]. Estas instalaciones y las técnicas quirúrgicas están diseñadas para

evitar la infección de la zona quirúrgica pero no para preservar la asepsia de los tejidos extraídos. Por ello, se hace necesaria la asepsia de los tejidos antes o durante su procesamiento. En nuestro procedimiento inicial se utilizó solución de lavado con gentamicina y vancomicina una vez introducido el tejido en grado A, lo que suponía la introducción de un material contaminado en el interior de las cabinas de flujo laminar, además de no utilizar ningún antifúngico como medida preventiva. La alternativa que mejor se adaptó a nuestras necesidades fue la inmersión de la pieza quirúrgica en medio BASE 128 durante el tiempo de transporte del tejido, aproximadamente 3-4 horas desde la extracción hasta el inicio de su procesamiento. El fabricante establece en las especificaciones del producto que las mayores tasas de descontaminación se obtienen tras incubar los tejidos con el medio durante 6 horas a 37°C pero también posee cierta actividad cuando se mantienen a 4°C durante 3 horas, especialmente frente a *Staphylococcus coagulasa* negativos y *Candida albicans*. En nuestra experiencia, el medio BASE 128 fue capaz de eliminar la posible contaminación asociada a los tejidos y no se detectó ninguna contaminación de los mismos desde su utilización.

Algunas guías sugieren el establecimiento de un plan de monitorización del personal con el fin de evaluar tendencias en el grado de biocontaminación de la vestimenta tras su colocación, con recualificaciones anuales [89] [154]. En este sentido, varios autores proponen la colocación de placas de sedimentación durante los procedimientos de vestimenta y la toma de muestras con placas de contacto tras finalizar la actividad en la instalación con el fin de valorar y detectar personal con gran capacidad de generación y dispersión de partículas [155] [156].

En nuestra Unidad se realizó una cualificación inicial y un control anual del personal propio de la Unidad y del personal de limpieza, con el fin de reevaluar los procedimientos de vestimenta. El número de controles realizados aún no es suficiente para realizar un análisis de tendencias. En cuanto a la evaluación del personal tras finalizar las tareas de producción o de control de calidad, aunque puede ser adecuada en instalaciones de mayor envergadura y número de personal, resulta poco práctica en salas GMP como la nuestra, en la que tan sólo 2 personas del departamento de producción y 1 de control de calidad suelen entrar a las áreas clasificadas. La detección de ufc por placas de contacto sobre la vestimenta en una persona, puede no reflejar exactamente su comportamiento, ya que no sería posible descartar que esas partículas viables procedieran de descamación de otro compañero por sedimentación, en una habitación de reducidas dimensiones con flujo turbulento.

Por todo lo expuesto y por el hecho de que hasta la fecha los niveles de biocontaminación se consideran aceptables y no se ha producido contaminación alguna en los lotes de productos fabricados, podemos concluir que el análisis de

riesgos HACCP ha permitido detectar los puntos críticos del proceso, a la vez que ha supuesto un importante ahorro de recursos económicos y de personal (al reducir considerablemente el número de puntos de muestreo y el tiempo empleado en las labores de monitorización) sin menoscabo de la calidad ambiental de la instalación ni del producto terminado. A partir del análisis de tendencias se han establecido los niveles de alerta, acción y medidas correctoras correspondientes.

Microbiota presente en la instalación

El estudio del rango, tipos y patrones de microorganismos que se encuentran en una instalación puede proporcionar información esencial para el mantenimiento de la biocontaminación ambiental [126]. Para decidir qué método o combinación de métodos se va a emplear en la desinfección de una sala blanca, es necesario establecer el tipo de bacterias y hongos habituales en cada instalación. Por ello, el conocimiento de la diversidad microbiana, así como cualquier característica extrema que éstos puedan poseer, es esencial para el desarrollo de programas de desinfección.

Existen 2 grandes limitaciones cuando se revisan los resultados de los microorganismos presentes en este tipo de instalaciones. La primera de ellas es que el patrón de microorganismos encontrados depende de múltiples factores tales como el número de personas que habitualmente hacen uso de la instalación, las condiciones de temperatura y humedad, etc. [157]. La segunda es el método de identificación de microorganismos utilizado ya que depende directamente de la base de datos usada para comparar los resultados obtenidos [126] y de la metodología empleada (análisis fenotípico, genotípico o proteómico). Dado que la identificación genotípica de microorganismos ambientales queda reducida a fines de investigación, las alternativas para la identificación microbiana se reducen fundamentalmente a los métodos fenotípicos generalmente utilizados [126] o a la implantación en los últimos años de métodos proteómicos como el sistema Maldi-tof, con una mayor especificidad que los métodos fenotípicos.

Los resultados obtenidos mediante la identificación con el sistema Maldi-tof muestran que los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia tanto en los controles ambientales volumétricos como de superficies son cocos Gram positivos de la familia Micrococaceae (género *Micrococcus*, 31,6% y *Kocuria* 11,1%), seguido por la familia Staphylococaceae (género *Staphylococcus*, 28,7%); ambas familias están compuestas por microorganismos habitualmente asociados a la piel humana.

El tercer gran grupo fue el formado por bacilos Gram positivos de la familia Bacillaceae (constituidos casi exclusivamente por el género *Bacillus*, 13,4%). Su

principal hábitat es el suelo aunque también se encuentran suspendidos en el aire en forma de esporas [158] y normalmente se asocian a la biocontaminación durante la introducción de los materiales en las zonas clasificadas. Por otro lado, algunos de ellos son, a menudo, parte de la microbiota asociada a humanos [109].

Estos resultados coinciden con estudios previos [126] [159] [160], aunque en otros se observa que las especies del género *Staphylococcus* eran porcentualmente más abundantes que las especies del género *Micrococcus* [109] [161]. Este predominio de gérmenes Gram positivos puede deberse, además de a su presencia en la piel humana, a las condiciones ambientales de este tipo de instalaciones (ambientes secos con alta presión osmótica), ya que las bacterias Gram positivas se adaptan mejor a la desecación que provoca el flujo continuo de aire turbulento [162].

Existen muy pocos artículos publicados respecto a la contaminación fúngica de este tipo de instalaciones. Vijayakumar y cols. [130] encontraron que las especies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Curvularia* y *Fusarium* eran las más comunes en instalaciones destinadas a la fabricación de medicamentos. Utescher y cols. [161] encontraron que las especies de *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Alternaria*, y *Mycelia sterillia* eran las más abundantes en instalaciones dedicadas a la fabricación de vacunas en grado D de clasificación ambiental. En nuestro estudio, se identificaron en escasa proporción *Cryptococcus* y *Penicilium* en grado B durante los muestreos rutinarios y *Aspergillus* en la única contaminación observada en agua y superficies de incubadores ubicados en las Salas de Producción. En los muestreos volumétricos en grado D sí se aislaron frecuentemente colonias con micelios aéreos, especialmente en Vestuario D, que es la habitación contigua al área no clasificada, en concreto a un pasillo del hospital con mucho tránsito, aunque no se procedió a su identificación.

En el conocimiento del riesgo que supone el personal en una instalación dedicada a la fabricación aséptica de medicamentos ha supuesto un gran avance los hallazgos obtenidos a raíz del proyecto “Human Microbiome Project” (HMP, <http://hmpdacc.org/>), una iniciativa del instituto de salud americano. El objetivo del proyecto es identificar y caracterizar los microorganismos asociados a la superficie corporal, en capas profundas de la piel, saliva y mucosa oral, conjuntiva y en el tracto gastrointestinal de individuos sanos y enfermos. Este estudio muestra que la piel es un complejo ecosistema que mantiene una gran variedad de comunidades microbianas que habitan en distintos nichos que se ven afectados por la disponibilidad de nutrientes así como por otros factores tales como pH, humedad y temperatura corporal. Se ha demostrado la existencia de aproximadamente 1000 especies bacterianas correspondientes a 19 filum diferentes. De todos ellos, la

mayoría de las bacterias se han incluido en 4 filum mayoritarios: Actinobacteria (51,8%) que es un grupo de cocos Gram positivos que incluye *Micrococcus*, *Corynebacteria*, *Streptomyces* y *Propionibacteria*; Firmicutes (24,4%) que incluye a los géneros *Clostridia* y *Bacillus*; Proteobacteria (16,5%), que incluye una gran variedad de patógenos tales como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter* entre otros muchos géneros y el filum Bacteroides, compuesto una gran variedad de bacilos anaerobios Gram negativos no formadores de esporas [156].

A partir de estos datos, se han descrito tres principales áreas ecológicas de la piel: sebáceas, húmedas y secas. Las especies de *Propionibacterium* y estafilococos predominan en las áreas sebáceas (con un alto contenido graso). En los brazos y las piernas predominan las áreas secas y callosas donde habitan cocos Grampositivos (principalmente Micrococáceas). El torso se encuentra predominantemente colonizado por bacilos Gram positivos. Estafilococos y *Corynebacterias* se encuentran junto con algunas bacterias Gram negativas en zonas húmedas [129]. Estos tipos de microorganismos son, generalmente, los encontrados en salas blancas [163].

Evaluación de datos de biocontaminación ambiental mediante herramientas basadas en análisis de tendencias. Valoración de la eficacia de los procedimientos implantados

Desde principio de los años 80, los fabricantes de productos estériles han establecido niveles de alerta y acción en el control de la biocontaminación ambiental. Con los nuevos avances en el diseño y fabricación de salas blancas, la diferencia entre niveles de alerta y acción se han hecho muy pequeñas, especialmente en zonas clasificadas como ISO 5 (equivalente a nuestro grado A) [90].

La Farmacopea Europea 2.6.12 “Microbiological examination of Non-Sterile Products (Total Viable Aerobic Count) [164] reconoce la imprecisión inherente a los métodos de muestreo microbiológico permitiendo que un resultado exceda los criterios de aceptación en no más de un factor de 5. De forma parecida, la Farmacopea Americana, USP <51> “Antimicrobial Effectiveness Test” [165] indica que pueden existir variaciones en los resultados cuando se toman múltiples muestras a lo largo del tiempo y permite una variabilidad de $\pm 0,5 \log_{10}$.

Debido a la variabilidad inherente a las técnicas de muestreo y a los errores de muestreo, las supuestas diferencias entre un nivel de alerta de 1 ufc y un nivel de acción de 3 ufc no son significativas [90]. La mayoría de los recuentos microbiológicos realizados en Clase 100 (ISO 5, grado B “en reposo” o grado A “en funcionamiento”) no muestran recuperación de microorganismos y tal vez pudiera

hacerse una interpretación más significativa evaluando la proporción de muestras que revelan crecimiento, independientemente del número de ufc recuperadas [166]. Esas conclusiones coinciden con los datos obtenidos en nuestras instalaciones en las que la mayoría de los resultados de los muestreos volumétricos en grado B mostraron resultados de 0 ufc (80,8%) y, de forma análoga, la mayor parte de los muestreos de superficie mostraron resultados de 0 ufc (99,9% en grado A y el 94,6% en grado B).

A la imprecisión de los métodos de muestreo microbiológicos disponibles en la actualidad hay que añadir el hecho de que la mayoría de los microorganismos aislados proceden de partículas de descamación de la piel humana y, dependiendo del tamaño de la partícula, esta puede llevar adheridas una o varias partículas viables, lo que hace que los resultados de los muestreos en este tipo de instalaciones se observe de forma habitual el crecimiento en forma de “clusters” o agregados, es decir, varias colonias que se solapan unas a otras haciendo, en ocasiones, muy impreciso el recuento y aislamiento en caso necesario. Según lo descrito por Tham & Zuraimi [151], las partículas de tamaño entre 3 y 7,5 μm , transportan más de una partícula viable y estas se presentan como agregados, mientras que en el rango de partículas entre 1 y 2 μm , las bacterias se encuentran aisladamente.

Otro factor a tener en cuenta es el momento elegido para tomar las muestras y la habilidad para conseguir trazar el estado real de cada sala de la instalación cuando se quieren realizar análisis de los resultados. En nuestra experiencia y, en el caso de los muestreo volumétricos, la cantidad de partículas totales y por extensión las partículas viables en suspensión, varían con el flujo de personas en la instalación durante el muestro o en un periodo de tiempo próximo al muestreo, por lo que se ha de estandarizar, en la medida de lo posible, el momento en el que se toman las muestras. En el caso de los muestreos de superficies, el número de microorganismos recuperados dependerá del número de éstos que se hayan depositado en las superficies, y sean capaces de sobrevivir o de formar esporas.

Teniendo en cuenta esta variabilidad, es muy importante establecer métodos reproducibles que aseguren la comparabilidad de resultados ya que, en ausencia de datos comparables, las herramientas de análisis de tendencias se convierten en un ejercicio inútil [166]. En nuestra Unidad, los muestreos se realizaron el día después de la limpieza rutinaria hasta diciembre de 2012 y a partir de enero de 2013 se realizaron tras un período de 6 días de utilización de la instalación (el día antes de la siguiente limpieza rutinaria de la instalación). Las muestras se tomaron el día fijado para el control ambiental, independientemente de que la instalación se hubiera utilizado el mismo día o no. Se realizaron controles en los que el personal de producción (habitualmente 2 personas) se encontraba en el interior de las salas y otros en los que no había personal. También es importante tener en cuenta el número

de cambios de vestuario realizado en la instalación el día del muestreo, ya que es una de las actividades que genera mayor liberación de partículas, y si el personal de Control de Calidad realizaba el muestreo volumétrico mientras procedía a tomar las placas de superficie de la misma habitación ya que el número de partículas generadas es considerablemente mayor que si se entra a una habitación para dejar el muestreador en funcionamiento e inmediatamente el personal abandona la sala. Todos estos factores se tienen en cuenta en la recogida de datos en nuestra instalación; el formulario de resultados de cada muestreo posee un campo donde se anotan número de cambios de vestuario el mismo día del muestreo, personal presente en cada sala durante el muestreo, si las salas han sido utilizadas anteriormente el mismo día, etc.

Dado que la principal fuente de contaminación es el personal que accede a la instalación, el nivel de biocontaminación observado debería relacionarse con el grado de utilización de la misma, hecho que se observa en los Vestuarios C y D. En el Vestuario B se aprecia una disminución del grado de biocontaminación a pesar del aumento de las entradas de personal, que podría tener su origen en las medidas implantadas a partir del análisis de riesgos y que han permitido contener la biocontaminación a pesar del aumento de actividad, por lo que cobran especial relevancia los procedimientos de Vestuario implantados.

En cuanto al cálculo de los niveles de alerta y acción mediante el uso de los percentiles 95 y 99 respectivamente, cuando no fue posible el cálculo del P99 debido al reducido número de resultados analizados, se seleccionó como nivel de acción el valor máximo de la serie. Esto significó que el nivel de acción se situó en los muestreos volumétricos en grado C en 95 ufc (año 2013), 22 ufc (2014), 58 ufc (2015) y 8 ufc (2016). Este criterio resultó en que en 2014 existiera una diferencia de 2 ufc entre los niveles de alerta y acción (20 y 22 ufc respectivamente) y de 1 ufc en 2016 (7 y 8 ufc respectivamente). La aplicación de este criterio conduce al establecimiento de unos niveles de alerta y acción muy próximos, con escasa utilidad en la práctica real. Por ello, al margen de cálculos matemáticos, los niveles de alerta y acción deberían situarse lo suficientemente distantes para evitar que pierdan su utilidad.

Las medidas correctoras establecidas inicialmente en caso de superación de los niveles de alerta o acción, incluían una limpieza ocasional y nuevo muestreo de la zona afectada en caso de la superación de los niveles de alerta y una limpieza ocasional, nuevo muestreo y reevaluación del personal (normas de comportamiento y vestuario) en caso de superación puntual de los niveles de acción. En nuestra experiencia, estas medidas no suponen un aumento en el control de la biocontaminación ya que, en primer lugar, los resultados de los controles se obtenían

justo antes de la siguiente limpieza de la instalación y en numerosas ocasiones era más práctico esperar al siguiente ciclo de limpieza-control que realizar una limpieza ocasional y un muestreo adicional.

Según nuestra experiencia, creemos conveniente la introducción de niveles de alerta y acción basados en análisis de tendencias más que en superaciones puntuales de los niveles establecidos, especialmente cuando estos valores se calculan y ajustan de forma que quedan muy por debajo de los límites de aceptación establecidos por las NCF. Así, por ejemplo tras la superación reiterada de los niveles de alerta en una misma sala debería analizarse si pueden ser causados por aumentos en la actividad de producción de la sala, aumento en el número de entradas de personal, superación del aforo máximo por sala durante los procesos de fabricación, aumento de la introducción y volumen de materiales almacenados, cambios en los procedimientos de vestuario y/o limpieza, pérdida de la integridad de filtros HEPA, etc., con el fin de establecer medidas correctoras adecuadas y útiles en función de la causa.

En opinión del autor, las medidas implantadas para controlar el nivel de biocontaminación de una instalación de este tipo deben basarse en el profundo conocimiento de los procesos que se realizan. Los puntos y frecuencias de muestreo han de seleccionarse de forma que se puedan obtener resultados valorables y analizables, por lo que es fundamental una homogeneidad en los métodos de muestreo (momento y forma en que se toman las muestras). Las medidas correctoras han de basarse en datos contrastados como el análisis de tendencias y no en excursiones puntuales. En este sentido, la Farmacopea Americana introdujo unos límites para cada grado de clasificación, en agosto de 2013, estimados mediante el porcentaje de placas que muestran crecimiento (aunque sólo sea 1 ufc) del total de las tomadas para un mismo grado, e independientemente del número de ufc aisladas, pudiendo de esta forma establecer con mayor eficacia una tasa de contaminación de un área, en el que la mayoría de los resultados son “cero” [90].

En definitiva, la presente tesis puede suponer un punto de partida para todo aquel que pretenda enfrentarse a la puesta en marcha de una instalación dedicada a la fabricación aséptica de medicamentos. Aporta una visión práctica, mediante el uso de herramientas basadas en análisis de riesgos, del proceso de identificación de las posibles fuentes de biocontaminación y del diseño de un Plan de Biocontaminación Ambiental adaptado a las necesidades de cada usuario mediante la implantación de medidas de análisis y control.

El análisis de los resultados del Plan de Biocontaminación, aplicado con un profundo conocimiento de los procesos de fabricación instaurados y de las particularidades estructurales de la instalación, ha permitido reducir significativamente el número de

puntos de muestreo, la frecuencia de estos y el uso de placas adicionales, como las utilizadas para el aislamiento selectivo de hongos (medio Sabouraud). Todas estas medidas han repercutido directamente en un importante ahorro de recursos económicos y de personal. El muestreo activo de aire en grado A durante las operaciones de fabricación aséptica ha sido discutido y no se cree relevante el uso de esta técnica; gracias al Plan de Biocontaminación Ambiental implantado, visto en su conjunto, se ha demostrado que la instalación se encuentra en perfecto estado de control.

Por otro lado, se ha ofrecido una visión práctica de la validación de medios de cultivo microbiológico, temperaturas de incubación, métodos de muestreo y ensayos de control de calidad como el “control microbiológico de productos celulares” (Eur. Ph. 2.6.27). Una de las aplicaciones más destacadas es la demostración de que las placas de sedimentación utilizadas son capaces de ser utilizadas durante un período de al menos 8 horas, lo que reduce significativamente el gasto económico y de recursos en salas de este tipo.

Finalmente, en este documento se aporta una visión basada en análisis de tendencias y establecimiento de niveles de alerta y acción “móviles” que se adaptan a las circunstancias cambiantes de cada instalación, haciendo útil el fin para el que se diseñaron: alarmas frente a una futura pérdida de control. Esta adaptación de niveles, junto con la implantación de medidas correctoras basadas en el análisis de tendencias demuestra que la implantación de estas medidas no se debe realizar frente a excursiones aisladas que superen los niveles de alerta y acción derivando en la aplicación de medidas correctoras injustificadas e ineficaces, sino mediante la constatación de un aumento tendencial de la biocontaminación de una zona.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

1. Las placas de medio TSA3 utilizadas para la monitorización de partículas viables en grado A pueden ser expuestas al menos hasta 8 horas, sin que la deshidratación producida por la recirculación del aire en la Cabina de Flujo Laminar de nuestra instalación influya en su capacidad posterior de recuperación de microorganismos.
2. Las placas de medio CT3P para el control de superficies son capaces de neutralizar los residuos de los biocidas evaluados por nuestra Unidad (dióxido de cloro-amonio cuaternario, péroxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y alcohol etílico e isopropílico al 70%), en condiciones reales de aplicación.
3. El sistema automatizado Bactex Fx es adecuado para determinar la esterilidad según Ph. Eur. 2.6.27. en medicamentos de terapia celular somática (suspensión celular de CMMTAd en Ringer lactato suplementado con 2,5% de glucosa y 1% de albúmina) con un 87,5% de sensibilidad y 80% de VPN en el caso de inóculos de 5 ufc, y con un 100% de sensibilidad y VPN en inóculos de 10 ufc.
4. El frasco Peds Plus/F muestra una sensibilidad y VPN superiores al frasco Plus Aerobic/F y al ensayo tradicional en el caso de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, no observándose diferencias en los demás gérmenes. *Candida albicans* mostró un crecimiento más rápido en los frascos Plus Aerobic/F y método tradicional. La combinación de frascos Peds Plus/F y Lytic Anaerobic/F se considera la mejor opción para realizar el ensayo de esterilidad según Ph. Eur. 2.6.27. en nuestros productos de terapia celular.
5. El procedimiento de limpieza y desinfección implantado y su frecuencia son eficaces para mantener la instalación bajo un adecuado estado de control de la biocontaminación. La combinación más eficaz de biocidas esporicidas la proporcionan el dióxido de cloro-amonio cuaternario y el péroxido de hidrógeno, utilizados en rotación.
6. El análisis de riesgos de biocontaminación ambiental en el proceso de fabricación aséptica implantado ha detectado 19 Puntos de Control Críticos y ha conseguido implantar un Plan de Control de Biocontaminación adaptado a las peculiaridades de nuestra instalación, en el que adquiere especial relevancia la cualificación microbiológica semestral y anual dependiendo del grado de clasificación ambiental.

Conclusiones

7. El control mediante placas de sedimentación “en funcionamiento” en grados y/o momentos diferentes al de la exposición del producto de Terapia Celular (grado A), carece de utilidad para calcular el riesgo de contaminación del producto, y se elimina de nuestro Programa de Muestreo Ambiental.
8. Los controles mediante placas de sedimentación “en reposo” en las zonas de grado B, C y D resultan irrelevantes, y se eliminan de nuestro Programa de Muestreo Ambiental.
9. La descongelación de reactivos en baño termostático supone un elevado riesgo de biocontaminación del ambiente al que es expuesto el producto. El riesgo disminuye considerablemente si se añade un desinfectante al agua y los reactivos se introducen doble embolsados en el baño, desechando la bolsa externa antes de su introducción al área clasificada.
10. Los tejidos adiposos extraídos en los quirófanos hospitalarios, habitualmente se encuentran contaminados por microorganismos saprofitos de la superficie corporal humana (piel y cuero cabelludo). La introducción de un paso de descontaminación del tejido con una combinación de antibióticos y antimicóticos durante su transporte consigue minimizar el riesgo de biocontaminación.
11. La calidad ambiental de nuestra instalación es adecuada para la fabricación aséptica de medicamentos, incluso en los periodos de máxima actividad. El 99,9% de las monitorizaciones de superficie en grado A no detectaron ningún microorganismo. En grado B, el 94,6% de los muestreos de superficie y el 80,8% de los muestreos volumétricos resultaron negativos.
12. Los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia en los controles ambientales de nuestra instalación son cocos Gram positivos (*Micrococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Kocuria spp.*, por este orden) relacionados con la flora saprofita de la piel, seguidos por *Bacillus spp.* (contaminante ambiental). Esta microbiota residente se mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo.
13. Los niveles de alerta y acción deben adaptarse periódicamente al estado real de utilización de la instalación.
14. Las medidas correctoras se deben tomar mediante el análisis de tendencias periódico y no por la superación puntual de los niveles establecidos.

Conclusiones

15. Las medidas implantadas para controlar el nivel de biocontaminación de una instalación de este tipo deben basarse en el profundo conocimiento de los procesos que se realizan. Las ubicaciones y frecuencias de muestreo han de seleccionarse de forma que representen los puntos de mayor riesgo y se puedan obtener resultados que pongan de manifiesto la situación real de la instalación. Un elevado número de puntos de muestreo o de su frecuencia no siempre deriva en un mejor control de la biocontaminación.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] “Reglamento (CE) No 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) no 726/2004.”
- [2] International Organization for Standardization, “EN-ISO 14698-1:2003: ‘Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Bio-Contamination Control – Part 1: General Principles and Methods.’” vol. 33, no. January 2002, 2004.
- [3] “Directiva 2009/120/CE de la Comisión de 14 de septiembre de 2009 que modifica la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano, en lo que se refiere a los medica.”
- [4] “Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano.” .
- [5] A. Izeta, C. Herrera, R. Mata, G. Astori, R. Giordano, C. Hernández, L. Leyva, S. Arias, S. Oyonarte, G. Carmona, and N. Cuende, “Cell-based product classification procedure: What can be done differently to improve decisions on borderline products?,” *Cytotherapy*, vol. 18, no. 7, pp. 809–815, 2016.
- [6] “Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distr.” .
- [7] “Directiva 2006/17/CE de la Comisión de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tej.” .
- [8] “Directiva 2006/86/CE de la Comisión de 24 de octubre de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los requisitos de trazabilidad, la notificación de las reacciones y los efectos adversos.”
- [9] “Directiva (UE) 2015/565 de la Comisión de 8 de abril de 2015 por la que se modifica la Directiva 2006/86/CE en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la codificación de células y tejidos humanos.”
- [10] “Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 2003 por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre

Bibliografía

- humana y sus componentes y po.” .
- [11] “Directiva 2004/33/CE de la Comisión de 22 de marzo de 2004 por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a determinados requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneos.” .
- [12] “Directiva 2005/61/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005 por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los requisitos de trazabilidad y a la notificación de reacciones y efectos adversos graves.” .
- [13] “Directiva 2003/94/CE de la Comisión de 8 de octubre de 2003 por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos de uso humano y de los medicamentos en investigación de uso humano.”
- [14] “Directiva de la Comisión de 23 de julio de 1991 por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos veterinarios.”
- [15] “Directiva 2005/62/CE de la Comisión de 30 de septiembre de 2005 por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las normas y especificaciones comunitarias relativas a un sistema de calidad para los.” .
- [16] European Commission, “EudraLex The Rules Governing Medicinal Products in the European Union EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use,” *EU Guidel. to Good Manuf. Pract. - Med. Prod. Humand Vet. Use*, no. August 2004, pp. 1–3, 2010.
- [17] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, “Prólogo. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario.”
- [18] “Directiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano.” .
- [19] “Directiva 91/412/CEE de la Comisión de 23 de julio de 1991 por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos veterinarios.” .
- [20] ICH Expert Working Group, “Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients Q7,” *ICH Harmon. Trpartite Guidel.*, no. November, p. 49, 2000.
- [21] AEMPS, “Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso

Bibliografía

- Humano y Veterinario. Anexo 13: Fabricación de medicamentos en investigación,” pp. 1–12, 2007.
- [22] “The Nuremberg Code (1947) In: Mitscherlich A, Mielke F. Doctors of infamy: the story of the Nazi medical crimes. New York: Schuman, 1949: xxiii-xxv.”
- [23] “The Belmont Report. Office of the Secretary Ethical Principles and Guidelines for the Protection of Human Subjects of Research The National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research. April 18, 1979.” .
- [24] A. M. Mundial., “Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos (<http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>),” *Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Fortaleza, Brasil: Asamblea General de la AMM*. 2013.
- [25] AEMPS, “Normas de Buena Práctica Clínica. Guía Tripartita armonizada de la ICH (CPMP/ICH/135/95).”
- [26] “Directiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 4 de abril de 2001 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros sobre la aplicación de buenas prácticas clínicas en la realiz.”
- [27] Ministerio de Sanidad y Consumo, “Real Decreto 223/2004 de 6 de Febrero por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. BOE. 2004. p. 5429–43.” *Boe*, pp. 5429–5443, 2004.
- [28] Ministerio de Sanidad y Consumo, “Real Decreto-ley 1345/2007, de 11 de octubre de 2007, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente.” *Bol. Of. del Estado*, pp. 45652–45698, 2007.
- [29] B. O. del Estado, “Real Decreto 824/2010, de 25 de junio, por el que se regulan los laboratorios Farmacéuticos, los fabricantes de principios activos de uso farmacéutico y el Investigación., comercio exterior de medicamentos y medicamentos en investigación.” pp. 39355–39357, 2014.
- [30] Comisión Europea, “Directiva 2005/28/CE de la Comisión de 8 de abril de 2005 por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de las buenas prácticas clínicas respecto a los medicamentos en investigación de uso humano, así como los requisitos para autori,” no. 8, pp. 13–19, 2005.
- [31] Ministerio de Sanidad y Consumo, “Orden SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano.” pp. 6295–6300, 2007.

Bibliografía

- [32] Ministerio de Sanidad y Consumo, “Orden SCO/362/2008, de 4 de febrero, por la que se modifica la Orden SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación.” .
- [33] “Felts, S.K., Schaffner, W., Melly, A., Koenig, M.G. Sepsis caused by contaminated intravenous fluids — epidemiological, clinical and laboratory investigation of an outbreak in one hospital. *Annals of Internal Medicine*, 77: 881–890, 1972.” .
- [34] “Fernandez, C., Wilhelmi, I., Andradas, E. et al. Nosocomial outbreak of *Burkholderia pickettii* infection due to a manufactured intravenous product used in three hospitals. *Clinical Infectious Diseases*, 22: 1092–1095, 1996.” .
- [35] R. M. Smith, M. K. Schaefer, M. A. Kainer, M. Wise, J. Finks, J. Duwve, E. Fontaine, A. Chu, B. S. Carothers, A. Reilly, J. Fiedler, A. D. Wiese, C. M. Feaster, L. Gibson, S. Griese, A. Purfield, A. A. Cleveland, K. Benedict, J. R. Harris, M. E. Brandt, D. Blau, J. Jernigan, J. T. Weber, and B. J. Park, “Fungal Infections Associated with Contaminated Methylprednisolone Injections for the Multistate Fungal Infection Outbreak Response Team,” *Bur. Epidemiol. Lansing (J. Finks, J. Fiedler) Indianap. N Engl J Med*, vol. 369, pp. 1598–609, 2013.
- [36] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Council of Europe., “European Pharmacopoeia (Ph. Eur 8th Edition). 5.1.1 Methods of preparation of sterile products,” no. 1, pp. 555–556, 2014.
- [37] International Organization for Standardization, “ISO 14644: Salas limpias y locales anexos. Parte 4: Diseño, construcción y puesta a punto.”
- [38] U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA), “21 CFR 211.67 Subpart D — Equipment cleaning and maintenance,” no. d, p. 217068, 2009.
- [39] Agencia Española de Medicamentos y, “Anexo I. Fabricación de medicamentos estériles. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario,” pp. 1–23, 2009.
- [40] International Organization for Standardization, “ISO 14644: Salas limpias y locales anexos. Parte 1: Clasificación de la limpieza del aire.” .
- [41] International Organization for Standardization, “ISO 14644: Salas limpias y locales anexos. Parte 2: Especificaciones para los ensayos y el control para verificar el cumplimiento continuo con la norma ISO 14644-1.” .
- [42] R.E.O. Williams, “Benefit and mischief from commensal bacteria,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 26, p. 811, 1973.
- [43] W.C. Noble, J.D.F. Habbema, R. Van Furth, “Quantitative studies on the

Bibliografía

- dispersal of skin bacteria into the air” *J. Med. Microbiol*, vol. 9, no. 1976, pp. 53–61, 1976.
- [44] W. C. Noble, O. M. Lidwell, and D. Kingston, “The size distribution of airborne particles carrying *Clostridium welchi*,” *J Pathol Bacteriol.*, vol. 81. pp. 523–6, 1962.
- [45] W. C. Noble, O. M. Lidwell, and D. Kingston, “The Size distribution of airborne particles carrying micro-organisms.,” *J. Hyg. (Lond).*, vol. 61, pp. 385–391, 1963.
- [46] J. Hill, A. Howell, and R. Blowers, “Effect of Clothing on Dispersal of *Staphylococcus Aureus* By Males and Females,” *Lancet*, vol. 2, 1974.
- [47] C. a Mackintosh, O. M. Lidwell, a G. Towers, and R. R. Marples, “The dimensions of skin fragments dispersed into the air during activity.,” *J. Hyg. (Lond).*, vol. 81, no. 3, pp. 471–479, 1978.
- [48] Mitchell and Gamble, “Clothing design for operating room personnel,” *Lancet*, vol. 2, 1974.
- [49] D. W. Bethune, R. Blowers, M. Parker, and E. A. Pask, “Dispersal of *Staphylococcus aureus* by patients and surgical staff ,” *Lancet*, vol. 1, no. 7383. pp. 480–483, 1965.
- [50] C. O. Solberg, “A study of carriers of *Staphylococcus aureus*,” *Acta. Med. Scand.*, vol. 178 (suppl, 1965).
- [51] E. Benediksdóttir and a Hambraeus, “Dispersal of non-sporeforming anaerobic bacteria from the skin.,” *J. Hyg. (Lond).*, vol. 88, no. 3, pp. 487–500, 1982.
- [52] J. Charnely and N. Eftekhar, “Penetration of Gown Material by Organisms from the Surgeon’s Body,” *Lancet*. pp. 172–174, 1969.
- [53] R. P. Clark and R. N. Cox, “The generation of aerosols from the human body,” *Airborne Transmission and Airborne Infection: Concepts and Methods*. pp. 413–426, 1973.
- [54] R. J. Holt, “Aerobic bacterial counts on human skin after bathing,” *J. Med Microbiol.*, vol. 4, pp. 319–327, 1971.
- [55] G. S. Hall, C. A. Mackintosh, and P. N. Hoffman, “The dispersal of bacteria and skin scales from the body after showering and after application of a skin lotion,” *J. Hyg., Camb*, vol. 97, pp. 289–298, 1986.
- [56] A. Mitchell, N. J., Evans, D. S. & Kerr, “Reduction of skin bacteria in theatre air with comfortable, non-woven disposable clothing,” *Br. Med. J.*, vol. 1, pp. 696–698, 1978.

Bibliografía

- [57] Dankert J. Zijlstra J. B. and Lubberding H., “A garment for use in the operating theatre: the effect upon bacterial shedding,” *J Hyg Cambridge*, vol. 82, no. 1, pp. 7–15, 1979.
- [58] “IEST-RP-CC003: Garment System Considerations for Cleanrooms and other Controlled Environments. Institute of Environmental Sciences, USA. Recommended Practice.” .
- [59] “Ramstorp, M. (2011) Microbial Contamination Control in Pharmaceutical Manufacturing. In Saghee, M.R., Sandle, T. and Tidswell, E. (Eds.) Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices, Business Horizons: New Delhi, pp 615-701.” .
- [60] P. P. Hegde, a T. Andrade, and K. Bhat, “Microbial contamination of ‘in use’ bar soap in dental clinics.,” *Indian journal of dental research*: official publication of Indian Society for Dental Research, vol. 17. pp. 70–73, 2015.
- [61] C. J. Griffith, R. Malik, R. A. Cooper, N. Looker, and B. Michaels, “Environmental surface cleanliness and the potential for contamination during handwashing,” *Am. J. Infect. Control*, vol. 31, no. 2, pp. 93–96, 2003.
- [62] T. Y. Yamamoto Y, Ugai K, “Efficiency of hand drying for removing bacteria from washed hands: comparison of paper towel drying with warm air drying.,” *Infect Control Hosp Epidemiol*, p. Mar 26 (3): 316–20, 2005.
- [63] “Encyclopedia of Clean Rooms, Bio-Cleanrooms and Aseptic Areas, 3rd Edition Acorn Industries.” .
- [64] M. G. Rosell Farrás and A. Muñoz Martínez, “Ventilación general en hospitales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo,” *Notas Técnicas de Prevención*, pp. 1–6, 2008.
- [65] “UNE 100713:2005 - Instalaciones de acondicionamiento de aire en hospitales.” 2005.
- [66] E. M. Sterling, A. Arundel, and T. D. Sterling, “Criteria for Human Exposure To Humidity in Occupied Buildings.,” *ASHRAE Transactions*, vol. 91, no. pt 1B. pp. 611–622, 1985.
- [67] “Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. PARTE II: Requisitos básicos para sustancias activas usadas como materiales de partida,” pp. 1–51.
- [68] G. McDonnell and A. D. Russell, “Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 1, pp. 147–179, 1999.
- [69] G. McDonnell, A. D. Russell, and S. S. BLOCK, “Disinfection, Sterilization, and Preservation,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 1. pp. 147–

Bibliografía

- 179, 1999.
- [70] L. W. Bush, L. M. Benson, and J. H. White, "Pig skin as test substrate for evaluating topical antimicrobial activity," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 24, no. 3. pp. 343–348, 1986.
- [71] C. E. Coulthard, "Germicidal effect of alcohol," *Pharm. J.*, no. 137, pp. 79–81, 1936.
- [72] S. P. Gorman and E. M. Scott, "Uptake and media reactivity of glutaraldehyde solutions related to structure and biocidal activity," *Microbios Lett*, pp. 163–169, 1977.
- [73] S. P. Gorman, E. M. Scott, and A. D. Russell, "Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde," *J. Appl. Bacteriol.*, no. 48, pp. 161–190, 1980.
- [74] H. Kobayashi, M. Tsuzuki, K. Koshimizu, H. Toyama, N. Yoshihara, T. Shikata, K. Abe, K. Mizuno, N. Otomo, and T. Oda, "Susceptibility of hepatitis B virus to disinfectants or heat," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 20, no. 2. pp. 214–216, 1984.
- [75] E. G. M. Power, "Aldehydes as biocides," *Prog. Med. Chem.*, no. 34, pp. 149–201, 1995.
- [76] A. D. Russell and M. J. Day, "Antibacterial activity of chlorhexidine," *Journal of Hospital Infection*, vol. 25, no. 4. pp. 229–238, 1993.
- [77] S. P. Denyer, "Mechanisms of action of antibacterial biocides," *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 36, no. 3–4. pp. 227–245, 1995.
- [78] J. B. Park and N. H. Park., "Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection," *Oral. Surg.*, no. 67, pp. 149–153, 1989.
- [79] Shaker L. A., B. N. Dancer, R. A.D., and J. R. Furr., "Emergence and development of chlorhexidine resistance during sporulation of *Bacillus subtilis*," *Microbiol. Lett*, no. 51, pp. 73–76, 1988.
- [80] A. D. Russell, "Activity of biocides against mycobacteria," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 81, no. i, p. 87S–101S, 1996.
- [81] Block SS, "Peroxygen compounds," in *In S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., 1991, pp. 185–204.*
- [82] Frier M., "Derivatives of 4-amino-quinaldinium and," in *In W. B. Hugo (ed.), Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press, Ltd., London, England., 1971, pp. 107–120.*
- [83] Resnick L., K. Varen, S. Z. Salahuddin, S. Tondreau, and P. D. Markham.,

Bibliografía

- “Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments,” *JAMA*, no. 255, pp. 1887–1891, 1986.
- [84] Health Products and Food Branch Inspectorate, “Guidance Document Cleaning Validation Guidelines - GUIDE-0028,” pp. 1–11, 2008.
- [85] “IEC 61025:1990. Fault tree analysis (FTA).” .
- [86] “IEC 60812:1985, Analysis techniques for system reliability. Procedure for failure mode and effects analysis (FMEA).” .
- [87] M. D. Pierson and D. A. Corlett, “HACCP: Principles and Applications.” New York Van Nostrand Reinhold, 1992.
- [88] Food and Agricultural Organisation of the United Nations, “Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System and Guidelines for its Application,” *Codex Alimentarius*. Alinorm 97/13. Annex to Appendix II. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Rome, 1995.
- [89] U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA), “Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing.,” 2004.
- [90] FDA, “<1116> *Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments.*,” vol. USP 36, no. 2. 2013, pp. 784–794.
- [91] International Organization for Standardization (ISO), “EN-ISO 14698-2:2003. Cleanrooms and associated controlled environments. Biocontamination control. Part 2: Evaluation and interpretation of biocontamination data,” vol. 3, no. 1, p. 32, 2003.
- [92] I. O. for S. ISO, “EN-ISO 13408-1. Aseptic processing of health care products. Part 1: General requirements,” vol. 14155, 2011.
- [93] International Organization for Standardization, “ISO 14971:2007. ‘Medical devices - Application of risk management to medical devices’.”, 2007.
- [94] FDA, “Guidance for Industry. Pharmaceutical CGMP Regulations Guidance for Industry,” *U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm.*, no. September, p. 32, 2006.
- [95] W. Whyte and N.D.S. Bell, “‘The prediction of airborne contamination of aseptically filled containers: a case study’ .” In Press.
- [96] AEMPS, “Directrices de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre la nomenclatura de las sustancias activas de los medicamentos en investigación de Terapia Avanzada que contengan células,” pp. 1–3, 2013.
- [97] “Partecke LI, Goerd AM, Langner I, Jaeger B, Assadian O, Heidecke CD,

Bibliografía

- Kramer A, Huebner NO. 'Incidence of microperforation for surgical gloves depends on duration of wear'. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009 May;30(5):409-14."
- [98] N. Hübner and A. Goerdt, "Bacterial migration through punctured surgical gloves under real surgical conditions," *BMC Infect. Dis.*, vol. 10, pp. 0–5, 2010.
- [99] D. A. Delgado, A. S. Sant' Ana, and P. R. Massaguer, "Occurrence of molds on laminated paperboard for aseptic packaging, selection of the most hydrogen peroxide- and heat-resistant isolates and determination of their thermal death kinetics in sterile distilled water," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 7, pp. 2609–2614, 2012.
- [100] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Council of Europe., "European Pharmacopoeia (Ph. Eur 8th Edition). 2.6.13 Microbiologica examination of non-sterile products: test for specified micro-organism," no. 3, pp. 1–5, 2009.
- [101] and M. B. C. Haley, L.D., J. Trandel, "Cumitech II, Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical microbiology laboratory," *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1980.
- [102] C. Wallis, J. L. Melnick, R. D. Wende, and P. E. Riel, "Rapid isolation of bacteria from septicemic patients by use of an antimicrobial agent removal device," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 11, no. 5, pp. 462–464, 1980.
- [103] P. C. Appelbaum, D. G. Beckwith, J. R. Dipersio, J. W. Dyke, J. F. Salventi, and L. L. Stone, "Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 17, no. 1, pp. 48–51, 1983.
- [104] J. K. Pohlman, B. A. Kirkley, K. A. Easley, B. A. Basille, and J. A. Washington, "Controlled clinical evaluation of BACTEC Plus Aerobic/F and BacT/Alert aerobic FAN bottles for detection of bloodstream infections," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, no. 11, pp. 2856–2858, 1995.
- [105] "European Pharmacopoeia (Ph. Eur 8th Edition): 2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration test." .
- [106] Andersen A, "New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles," *J Bacteriol*, vol. 76, pp. 471–84, 1958.
- [107] W. Feller, *An introduction to the probability theory and its application*. New York: John Wiley and sons, Inc., 1950.
- [108] J. K. Lutz, J. Crawford, A. E. Hoet, J. R. Wilkins, and J. Lee, "Comparative performance of contact plates, electrostatic wipes, swabs and a novel sampling device for the detection of *Staphylococcus aureus* on environmental surfaces,"

Bibliografía

- J. Appl. Microbiol.*, vol. 115, no. 1, pp. 171–178, 2013.
- [109] P. G. Martín, M. B. González, A. R. Martínez, V. G. Lara, and B. C. Naveros, “Isolation and characterization of the environmental bacterial and fungi contamination in a pharmaceutical unit of mesenchymal stem cell for clinical use,” *Biologicals*, vol. 40, no. 5, pp. 330–337, 2012.
- [110] J. W. Shin, H. R. Choi, and K. C. Park, “Stamp-form contact plate: A simple and useful culture method for microorganisms of the skin,” *Ann. Dermatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 126–128, 2013.
- [111] International Organization for Standardization, “UNE-ISO 18593:2013. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Métodos horizontales para las técnicas de toma de muestras a partir de superficies utilizando placas de contacto e hisopos,” pp. 6–8, 2009.
- [112] T. Sandle, “Examination of the Order of Incubation for the Recovery of Bacteria and Fungi from Pharmaceutical-grade Cleanrooms,” *Int J Pharm Compd*, vol. 18, no. 3, pp. 242–247, 2014.
- [113] “2.6.27 Microbiological control of cellular products. European Pharmacopoeia (Ph. Eur 8 th Edition).” .
- [114] S. Parveen, S. Kaur, S. A. W. David, J. L. Kenney, W. M. McCormick, and R. K. Gupta, “Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products &,” *Vaccine*, vol. 29, no. 45, pp. 8012–8023, 2011.
- [115] “Actividad bactericida en condiciones de uso. UNE-EN 1276: 2010, Erratum 2011. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la indust.” .
- [116] “Actividad fungicida en condiciones de uso. Norma UNE-EN 1650:2008 + A1:2013. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida de los antisépticos y desinfectantes químicos .” .
- [117] “Actividad esporicida básica UNE EN 14347_2005.pdf.” .
- [118] “Actividad esporicida en condiciones de uso UNE-EN 13704_2002.pdf.” .
- [119] “Actividad bactericida-fungicida en superficies no porosas. UNE- EN-13697:2015. Actividad bactericida y/o fungicida sobre superficies no porosas.” .
- [120] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, “Anexo 15. Cualificación y validación. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario.”

Bibliografía

- [121] T. Sandle, "Environmental Monitoring Risk Assessment," *J. GXP Compliance*, vol. 10, no. 2, pp. 54–73, 2006.
- [122] S. Edición, "Comisión Del Codex Alimentarius. programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del codex alimentarius. 22^a reunión, Ginebra. Organización Mundial de la Salud," pp. 23–28, 1997.
- [123] S. Sutton, "The Environmental Monitoring Program in a GMP Environment. Microbiology Topics.," *J. GXP Compliance*, vol. 14, no. 3, pp. 22–30, 2010.
- [124] W. Whyte, "Collection efficiency of microbial methods used to monitor cleanrooms.," *Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 3–7, 2005.
- [125] Ó. Esparcia and J. Magraner, "Moraxella catarrhalis y su implicación en la patología infecciosa," 1896.
- [126] T. Sandle, "A Review of Cleanroom Microflora: Types, Trends, and Patterns," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 65, pp. 392–403, 2011.
- [127] H. H. Kong and J. A. Segre, "HHS Public Access," vol. 132, pp. 933–939, 2012.
- [128] M. T. Madigan, "Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments," *Photosynthesis Research*, vol. 76, no. 1–3, pp. 157–171, 2003.
- [129] Y. E. Chen and H. Tsao, "The skin microbiome: Current perspectives and future challenges," *Journal of American Dermatology*, vol. 69, no. 1, pp. 143–155.e3, 2013.
- [130] M. C. Vijayakumar R, Sandle T, "A review of fungal contamination in pharmaceutical products and phenotypic identification," *Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.*, vol. 17, pp. 4–19, 2012.
- [131] Abe M, O. Z, and T. et Al., "Study of mycological examination methods in clinical laboratories-specimen pretreatment and isolation," *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, no. 50(4), pp. 235–242., 2009.
- [132] W. Whyte and L. Niven, "Airborne bacteria sampling: the effect of dehydration and sampling time," *J Parenter Sci Technol*, vol. 40, no. 5, pp. 182–188, 1986.
- [133] G. Daneau, E. Nduwamahoro, K. Fissette, P. Rüdelsheim, D. van Soolingen, B. C. de Jong, and L. Rigouts, "Use of RODAC plates to measure containment of Mycobacterium tuberculosis in a Class IIB biosafety cabinet during routine operations," *Int. J. Mycobacteriology*, vol. 5, pp. 2–8, 2016.
- [134] S. W. Lemmen, H. Häfner, D. Zollmann, G. Amedick, and R. Lutticken, "Comparison of two sampling methods for the detection of Gram-positive and Gram-negative bacteria in the environment: moistened swabs versus Rodac plates," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 203, no. 3, pp. 245–248, 2001.

Bibliografía

- [135] M. St??rmer, E. M. Wood, U. Schurig, O. Karo, I. Spreitzer, C. P. McDonald, and T. Montag, “Bacterial safety of cell-based therapeutic preparations, focusing on haematopoietic progenitor cells,” *Vox Sang.*, vol. 106, no. 4, pp. 285–296, 2014.
- [136] D. Hocquet, M. Sauget, S. Roussel, C. Malugani, F. Pouthier, P. Morel, H. Gbaguidi-Haore, X. Bertrand, and F. Grenouillet, “Validation of an automated blood culture system for sterility testing of cell therapy products,” *Cytotherapy*, vol. 16, no. 5, pp. 692–698, 2014.
- [137] H. M. Khuu, F. Stock, M. McGann, C. S. Carter, J. W. Atkins, P. R. Murray, and E. J. Read, “Comparison of automated culture systems with a CFR/USP-compliant method for sterility testing of cell-therapy products.,” *Cytotherapy*, vol. 6, no. 3, pp. 183–195, 2004.
- [138] “Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas. BOE núm. 20 de 24/1/1984.” .
- [139] “Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 162/1991, de 8 de febrero, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas. BOE num. 40 de 15/2/1991.” .
- [140] “Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 443/1994, de 11 de marzo, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas. BOE num. 76 de 30/3/1994.” .
- [141] “AFNOR NF T 72-190: détermination de l’activité antibactérienne pour la décontamination des surfaces.” .
- [142] K. Poole, “Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 92, no. Levy 2000, p. 55S–64S, 2002.
- [143] D. G. White and P. F. McDermott, “Biocides, drug resistance and microbial evolution,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 4, no. 3. pp. 313–317, 2001.
- [144] S. Sutton, “Disinfectant Rotation. A Microbiologist’s View.,” *Control. Environ.*, 2005.
- [145] B. Reinmüller and B. Ljungqvist, “Modern cleanroom clothing systems: people as a contamination source,” *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2003.
- [146] W. Whyte, “In Support of Settle Plates,” *PDA J Pharm Sci Technol*, vol. 50, no. 4, pp. 201–04, 1994.

Bibliografía

- [147] R. R. Davies and W. C. Noble, "Dispersal of bacteria on desquamated skin.," *Lancet*, vol. 2, no. 7269. pp. 1295–1297, 1962.
- [148] J. Hill, A. Howell, and R. Blowers, "Effect of Clothing on Dispersal of Staphylococcus Aureus By Males and Females," *Lancet*, vol. 304, no. 7889, pp. 1131–1133, 1974.
- [149] H. A. McLure, M. Mannam, C. A. Talboys, B. S. Azadian, and S. M. Yentis, "The effect of facial hair and sex on the dispersal of bacteria below a masked subject," *Anaesthesia*, vol. 55, no. 2, pp. 173–176, 2000.
- [150] W. Whyte, D. Vesley, and R. Hodgson, "Bacterial dispersion in relation to operating room clothing.," *J. Hyg. (Lond)*., vol. 76, no. 3, pp. 367–378, 1976.
- [151] K. W. Tham and M. S. Zuraimi, "Size relationship between airborne viable bacteria and particles in a controlled indoor environment study.," *Indoor Air*, vol. 15 Suppl 9, no. Suppl 9, pp. 48–57, 2005.
- [152] W. Whyte, "Sterility assurance and models for assessing bacterial contamination.," *J Parenter Sci Technol*, vol. 40, pp. 188–97, 1995.
- [153] AENOR, "AENOR- Norma UNE171340:2012 Validación y cualificación de salas de ambiente controlado en hospitales," pp. 1–32, 2012.
- [154] B. T. Sandle, "Peer Reviewed□: Cleanroom Contamination," pp. 1–9, 2015.
- [155] "UNE-EN ISO 13408-1:2015 Procesado aséptico de productos para la salud. Parte 1: Requisitos generales."
- [156] T. Sandle, "People in Cleanrooms: Understanding and Monitoring the Personnel Factor," *Journal of GXP Compliance*, vol. 18, no. 4. pp. 1–22, 2014.
- [157] W. Whyte, "Cleanroom Technology: Fundamentals of Design, Testing, and Operation," *John Wiley and Sons*. pp. 243–246, 2001.
- [158] E. Underwood, "Ecology of Microorganisms as it affects the Pharmaceutical Industry," *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology: Seventh Edition*. pp. 249–262, 2007.
- [159] G. Wu and X. Liu, "Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit.," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 8, no. 9, pp. 666–672, 2007.
- [160] F. Cobo and Á. Concha, "Environmental microbial contamination in a stem cell bank," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 44, no. 4, pp. 379–386, 2007.
- [161] C. L. D. A. Utescher, M. R. Franzolin, L. R. Trabulsi, and V. Gambale, "Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 38, no. 4, pp. 710–716, 2007.

Bibliografía

- [162] N. S. Sheraba, A. S. Yassin, and M. a Amin, “High-throughput molecular identification of *Staphylococcus* spp. isolated from a clean room facility in an environmental monitoring program.,” *BMC Res. Notes*, vol. 3, no. 1, p. 278, 2010.
- [163] E. A. Grice, H. H. Kong, and Conlan S, “Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome.,” *Science (80-.)*, vol. 324, pp. 1190–1192, 2009.
- [164] Farmacopea europea 2.6.12, “Examination of Non-Sterile Products: Total viable aerobic count. 5th Edition,” 2007.
- [165] “USP 39 - NF 22. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2004.” .
- [166] D. Hussong and E. Madsen, “Analysis of environmental microbiology data from cleanroom samples,” *Pharm. Technol. Aseptic Process. 2004*, pp. 10–15.
- [167] “Sociedad española de Microbiología Clínica (SEIMC). Procedimientos en Microbiología Clínica 3a. Hemocultivos.” .

Anexos



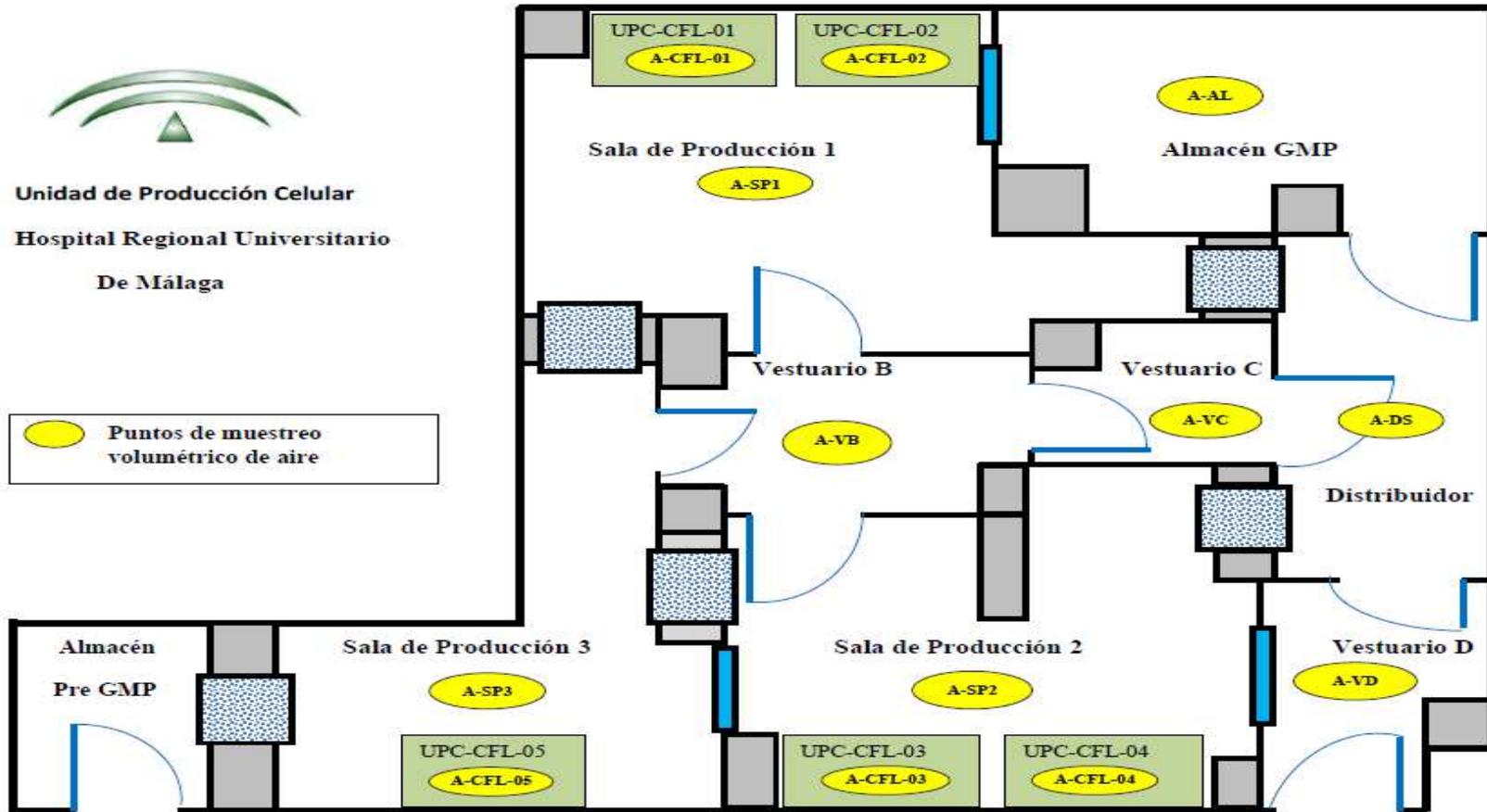
UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Anexo I: Tabla para la corrección estadística de Feller.

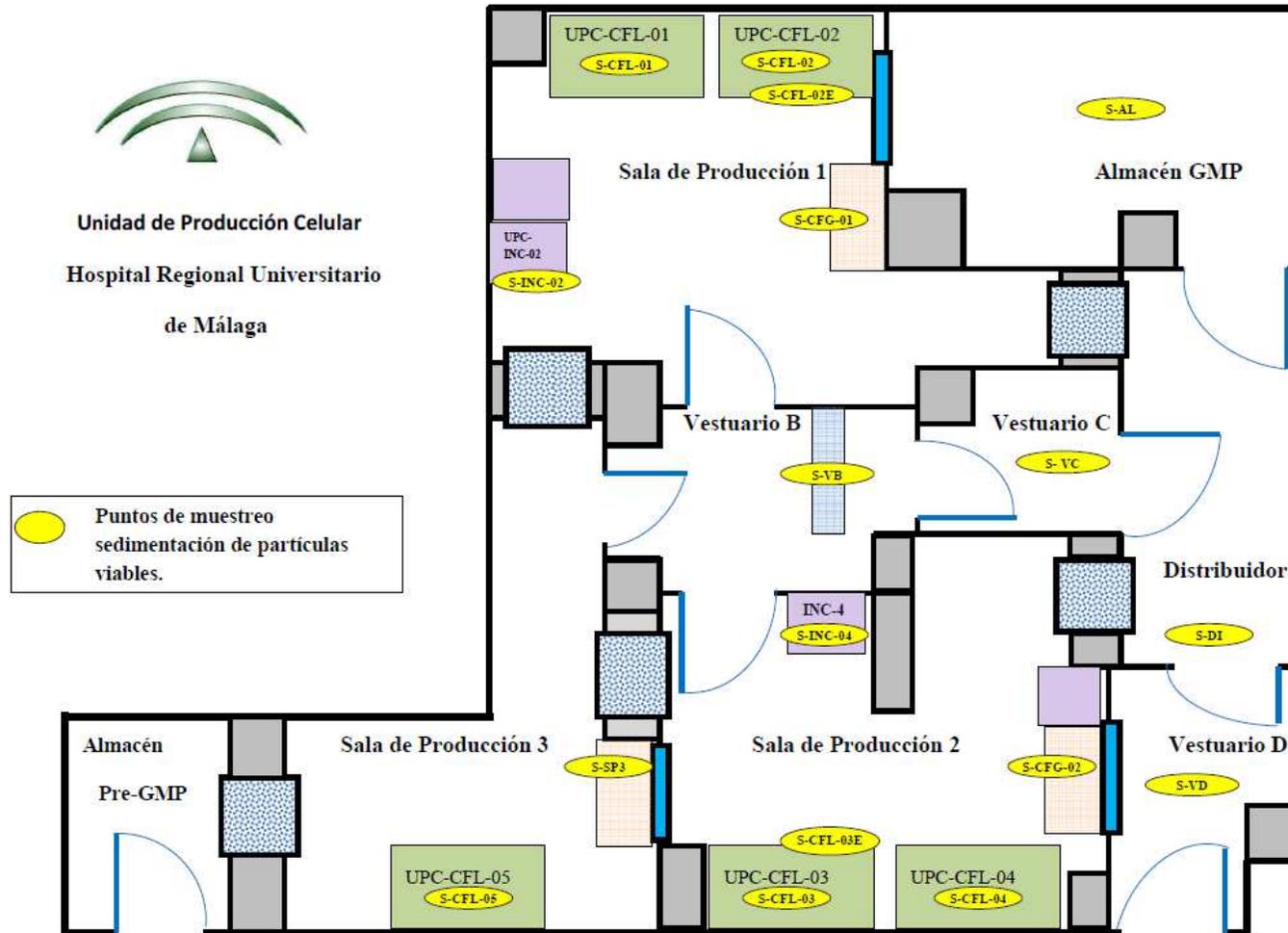
r = Number of colony forming units counted on standard Petri dish Pr = Probable statistical total

r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr
1	1	51	54	101	116	151	189	201	279	251	394	301	557	351	836
2	2	52	56	102	118	152	191	202	281	252	397	302	561	352	844
3	3	53	57	103	119	153	193	203	283	253	400	303	565	353	853
4	4	54	58	104	120	154	194	204	285	254	402	304	569	354	861
5	5	55	59	105	122	155	196	205	287	255	405	305	573	355	870
6	6	56	60	106	123	156	197	206	289	256	408	306	578	356	879
7	7	57	61	107	124	157	199	207	291	257	411	307	582	357	888
8	8	58	63	108	126	158	201	208	293	258	413	308	586	358	897
9	9	59	64	109	127	159	202	209	295	259	416	309	591	359	907
10	10	60	65	110	128	160	204	210	297	260	419	310	595	360	917
11	11	61	66	111	130	161	206	211	299	261	422	311	599	361	927
12	12	62	67	112	131	162	207	212	301	262	425	312	604	362	937
13	13	63	68	113	133	163	209	213	304	263	428	313	608	363	947
14	14	64	70	114	134	164	211	214	306	264	431	314	613	364	958
15	15	65	71	115	135	165	212	215	308	265	433	315	618	365	969
16	16	66	72	116	137	166	214	216	310	266	436	316	622	366	981
17	17	67	73	117	138	167	216	217	312	267	439	317	627	367	992
18	18	68	74	118	140	168	218	218	314	268	442	318	632	368	1005
19	19	69	76	119	141	169	219	219	317	269	445	319	637	369	1017
20	20	70	77	120	142	170	221	220	319	270	449	320	642	370	1030
21	22	71	78	121	144	171	223	221	321	271	452	321	647	371	1043
22	23	72	79	122	145	172	224	222	323	272	455	322	652	372	1057
23	24	73	80	123	147	173	226	223	325	273	458	323	657	373	1071
24	25	74	82	124	148	174	228	224	328	274	461	324	662	374	1086
25	26	75	83	125	150	175	230	225	330	275	464	325	667	375	1102
26	27	76	84	126	151	176	232	226	332	276	467	326	673	376	1118
27	28	77	85	127	153	177	233	227	335	277	471	327	678	377	1134
28	29	78	87	128	154	178	235	228	337	278	474	328	684	378	1152
29	30	79	88	129	156	179	237	229	339	279	477	329	689	379	1170
30	31	80	89	130	157	180	239	230	342	280	480	330	695	380	1189
31	32	81	90	131	158	181	241	231	344	281	484	331	701	381	1209
32	33	82	92	132	160	182	242	232	346	282	487	332	706	382	1230
33	34	83	93	133	161	183	244	233	349	283	491	333	712	383	1252
34	35	84	94	134	163	184	246	234	351	284	494	334	718	384	1276
35	37	85	95	135	164	185	248	235	353	285	497	335	724	385	1301
36	38	86	97	136	166	186	250	236	356	286	501	336	730	386	1327
37	39	87	98	137	167	187	252	237	358	287	504	337	737	387	1356
38	40	88	99	138	169	188	254	238	361	288	508	338	743	388	1387
39	41	89	101	139	171	189	255	239	363	289	511	339	749	389	1420
40	42	90	102	140	172	190	257	240	366	290	515	340	756	390	1456
41	43	91	103	141	174	191	259	241	368	291	519	341	763	391	1496
42	44	92	104	142	175	192	261	242	371	292	522	342	769	392	1541
43	45	93	106	143	177	193	263	243	373	293	526	343	776	393	1591
44	47	94	107	144	178	194	265	244	376	294	530	344	783	394	1648
45	48	95	108	145	180	195	267	245	378	295	534	345	791	395	1715
46	49	96	110	146	181	196	269	246	381	296	537	346	798	396	1795
47	50	97	111	147	183	197	271	247	384	297	541	347	805	397	1895
48	51	98	112	148	185	198	273	248	386	298	545	348	813	398	2028
49	52	99	114	149	186	199	275	249	389	299	549	349	820	399	2228
50	53	100	115	150	188	200	277	250	391	300	553	350	828	400	2628

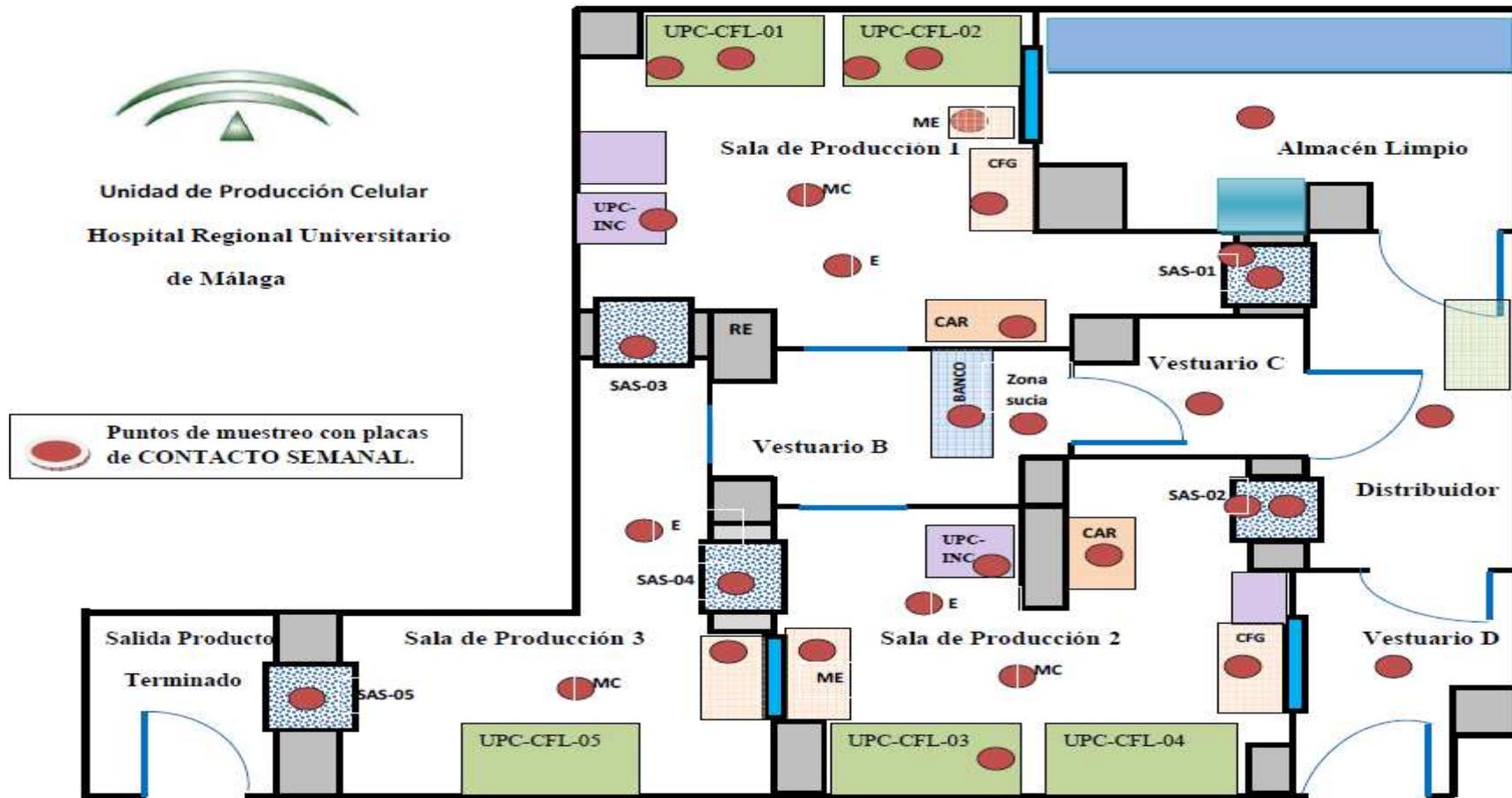
Anexo II: Puntos de muestreo volumétrico de aire. Estudio preliminar.



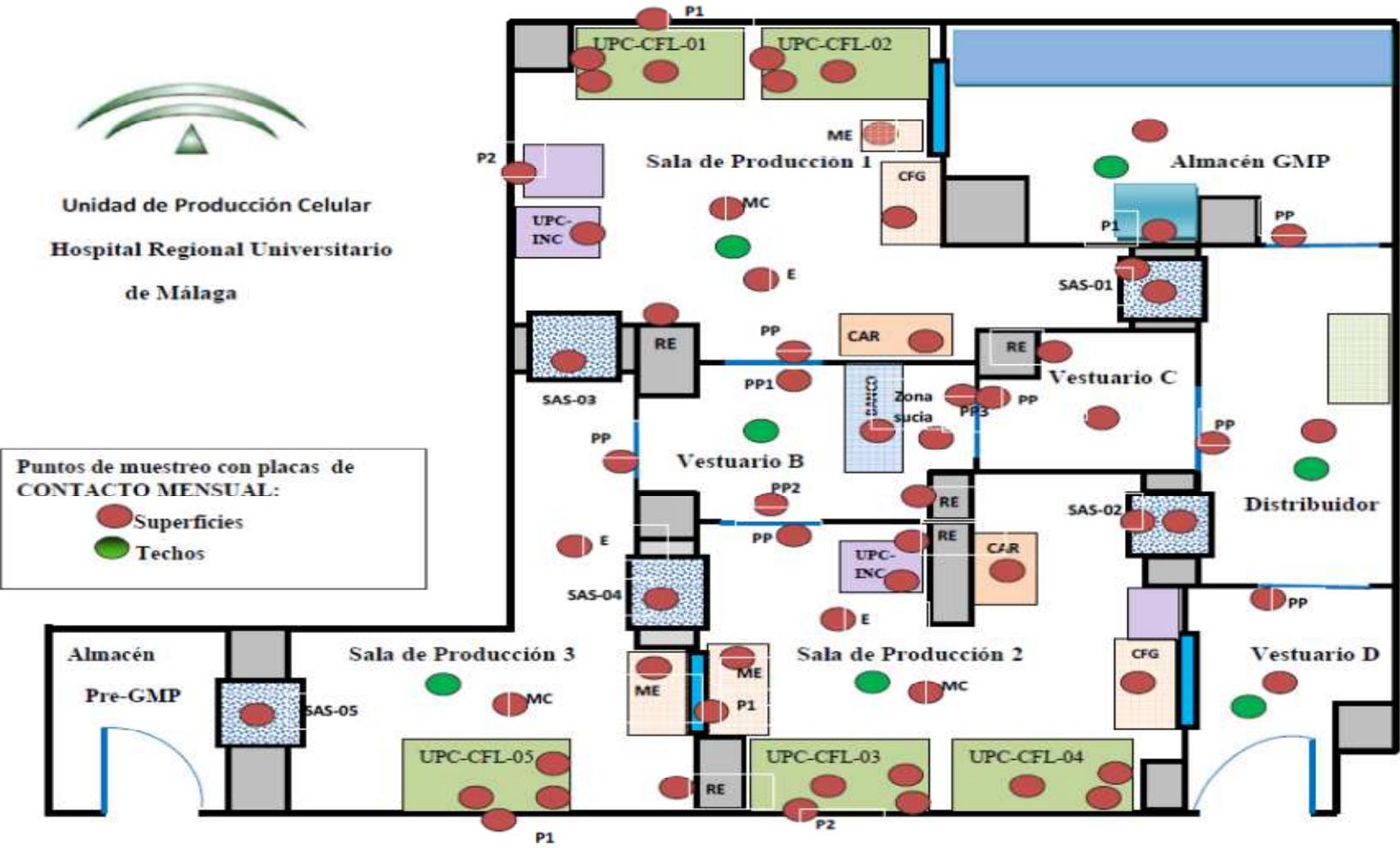
Anexo III: Puntos de muestreo de sedimentación de partículas viables. Estudio preliminar.



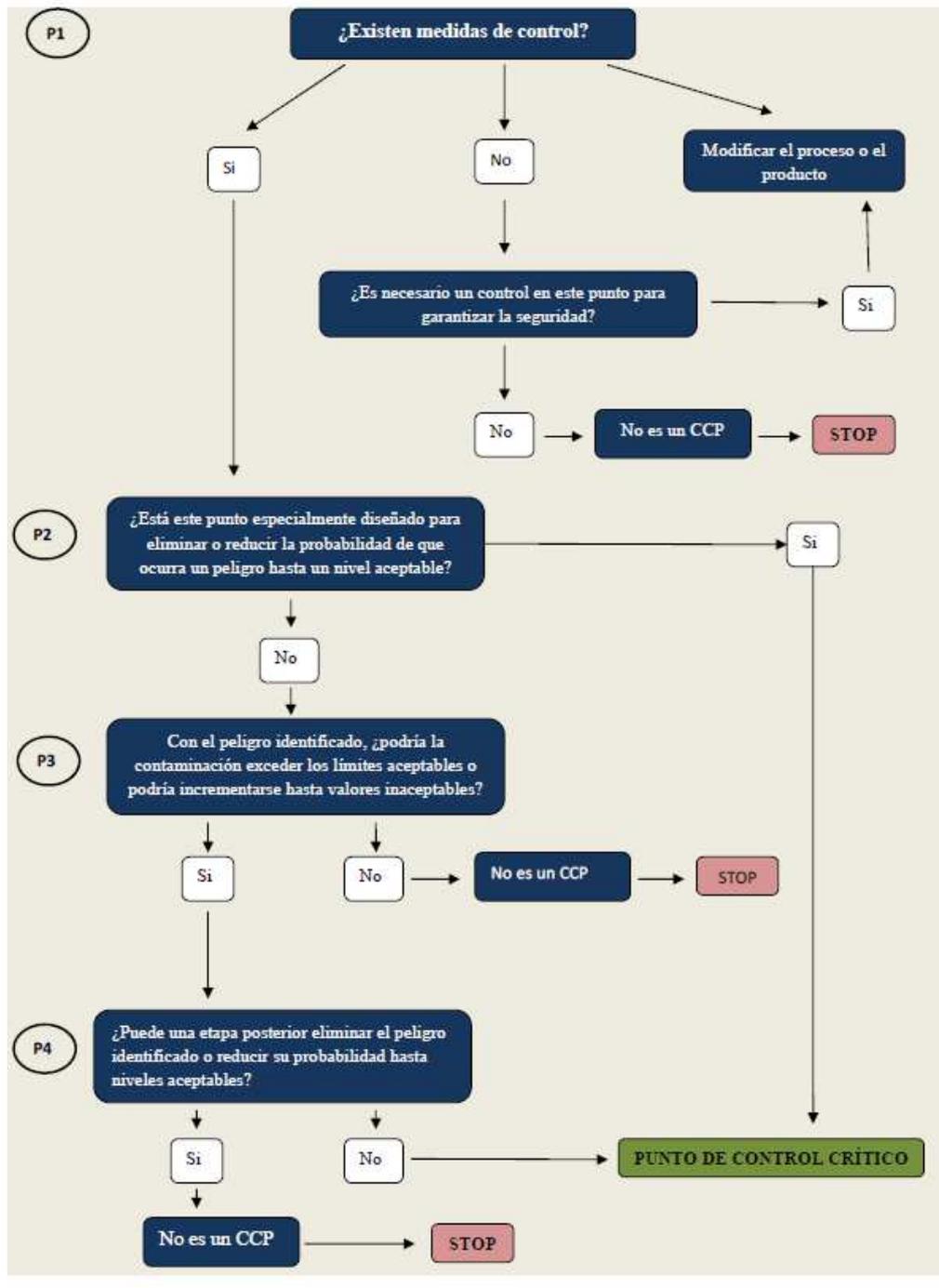
Anexo IV: Puntos de muestreo semanales mediante placas de contacto. Estudio preliminar.



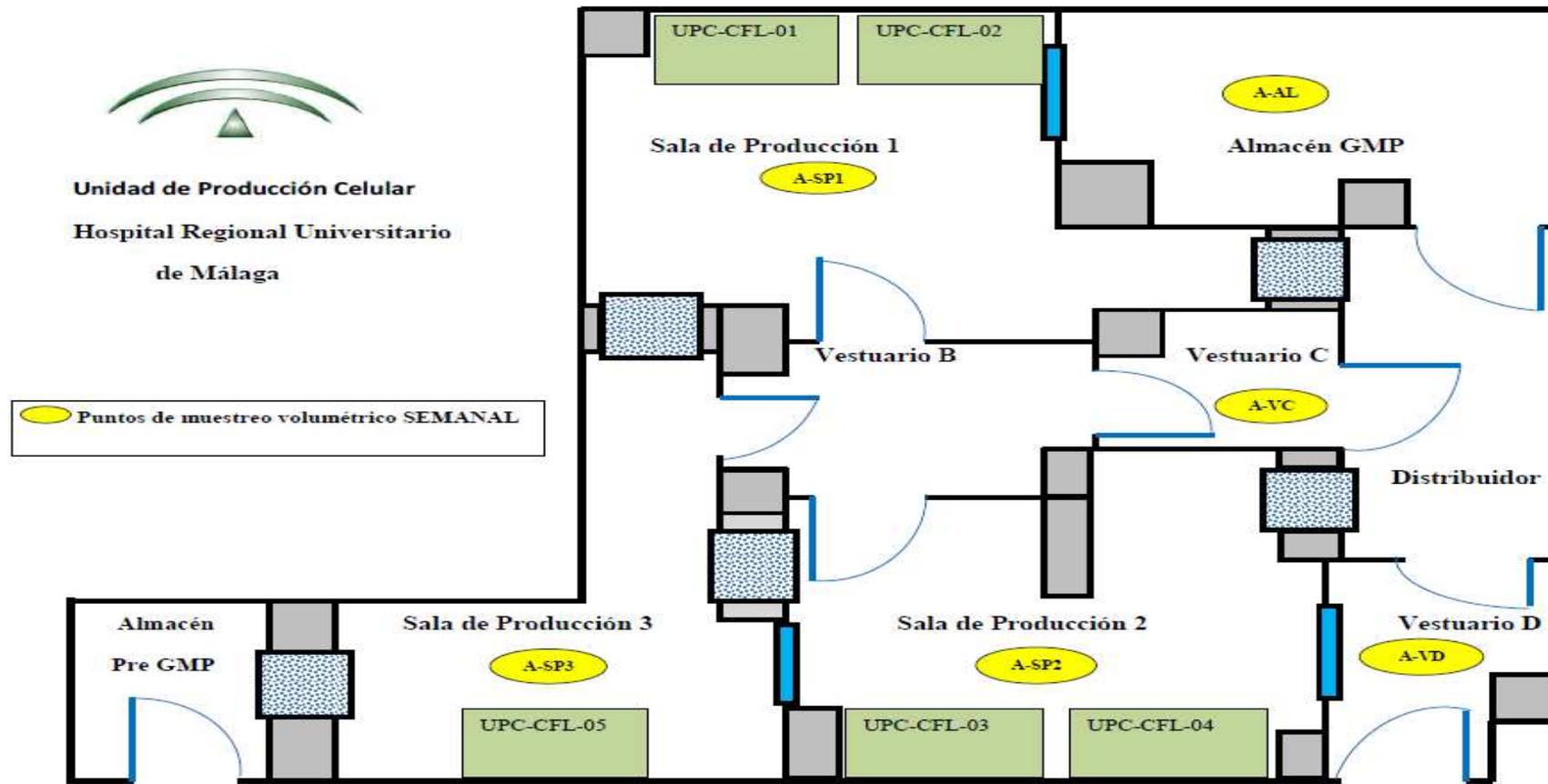
Anexo V: Puntos de muestreo mensuales mediante placas de contacto. Estudio preliminar.



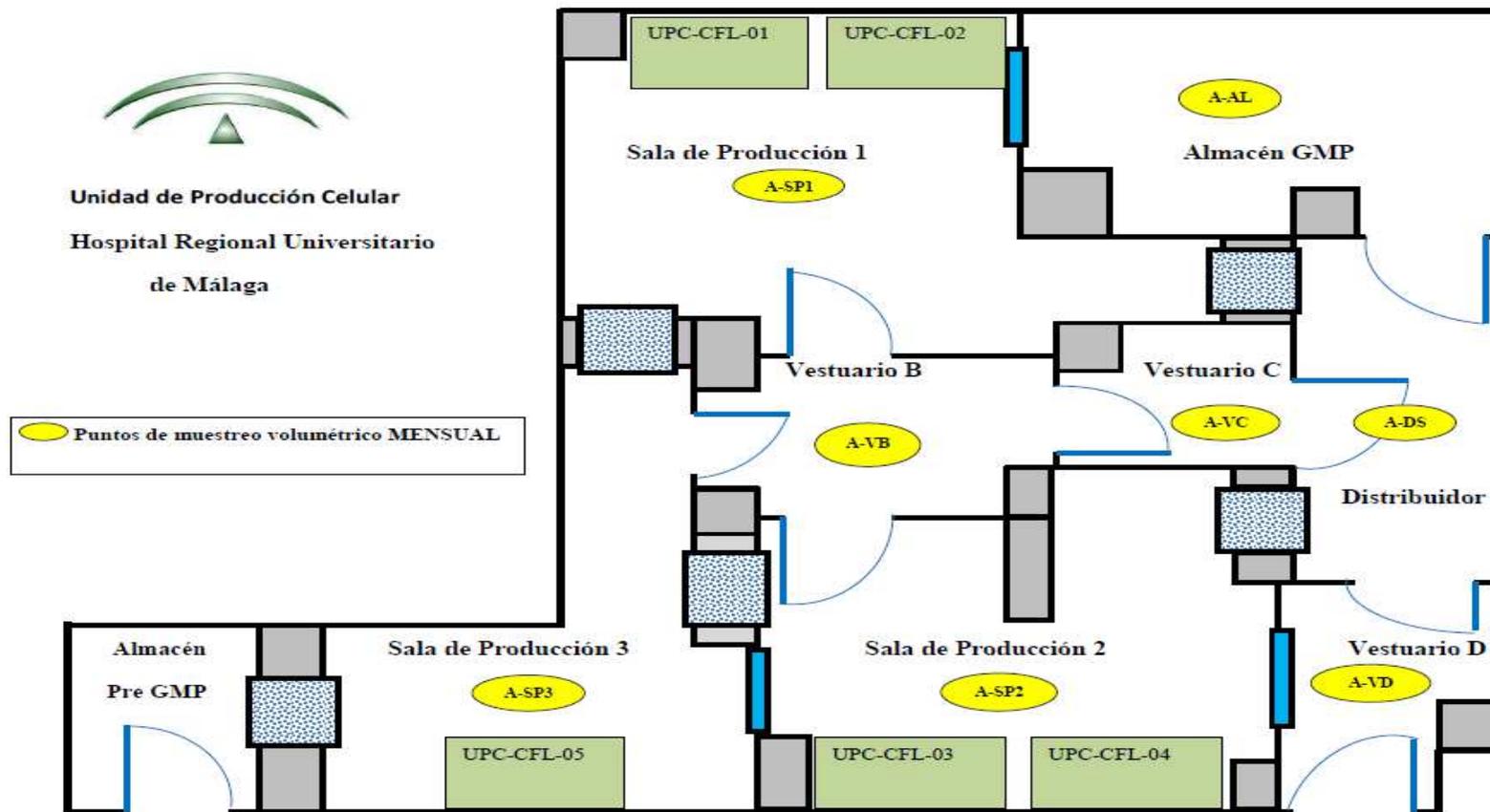
Anexo VI: Árbol de decisión para la identificación de Puntos de Control Críticos (PCCs)



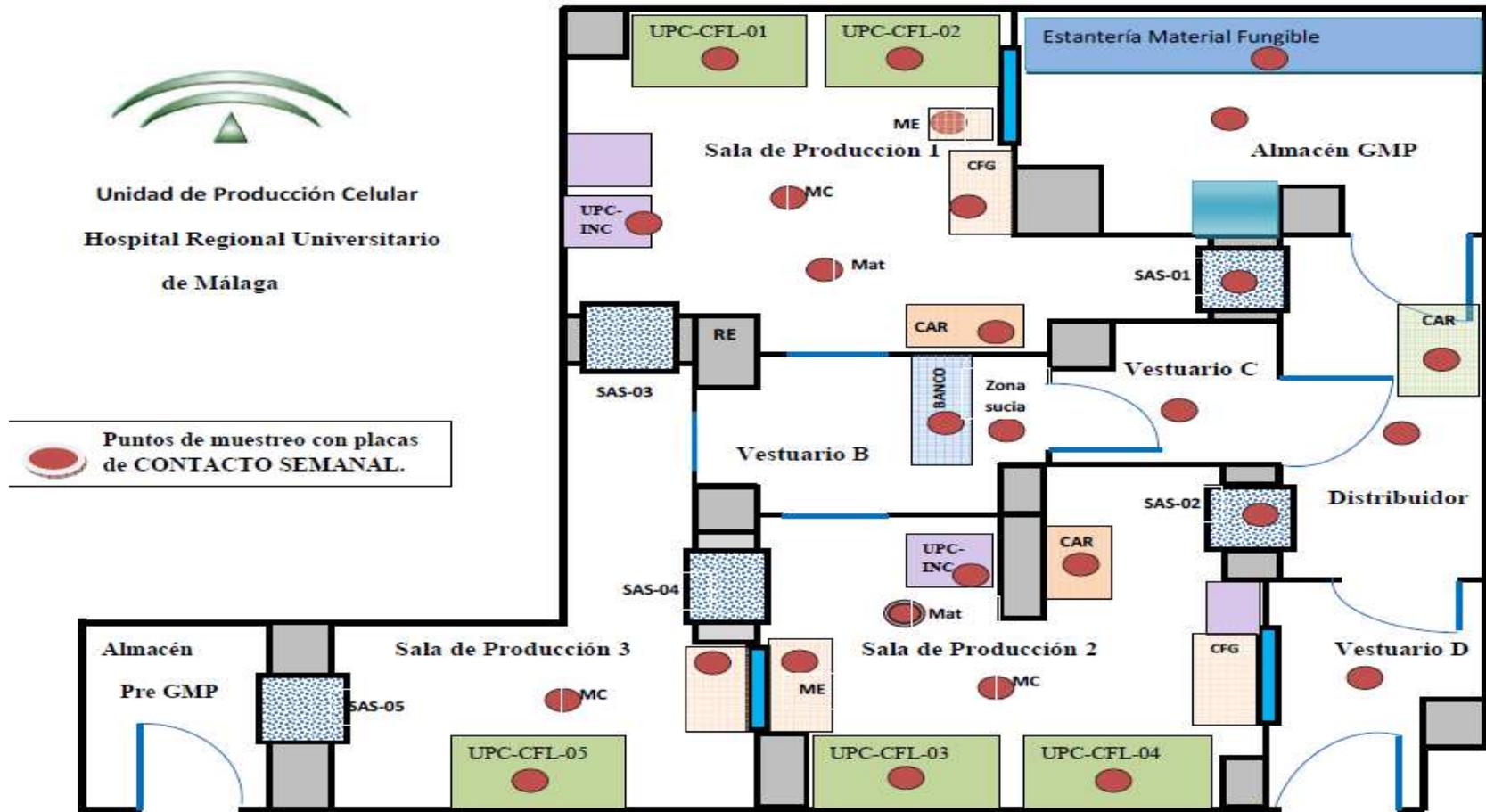
Anexo VII: Puntos de muestreo volumétrico de aire semanal tras análisis de riesgos.



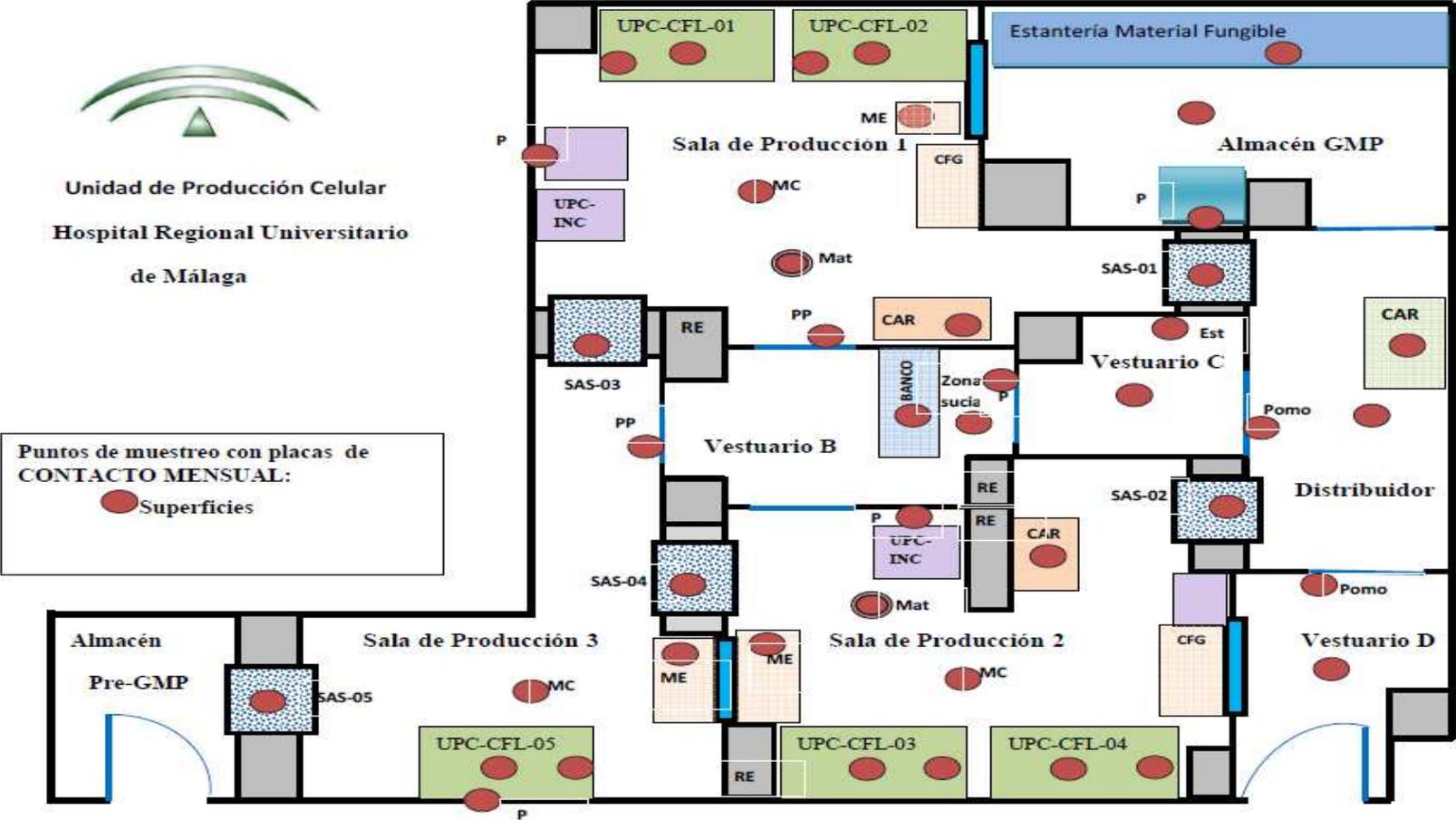
Anexo VIII: Puntos de muestreo volumétrico de aire mensual tras análisis de riesgos.



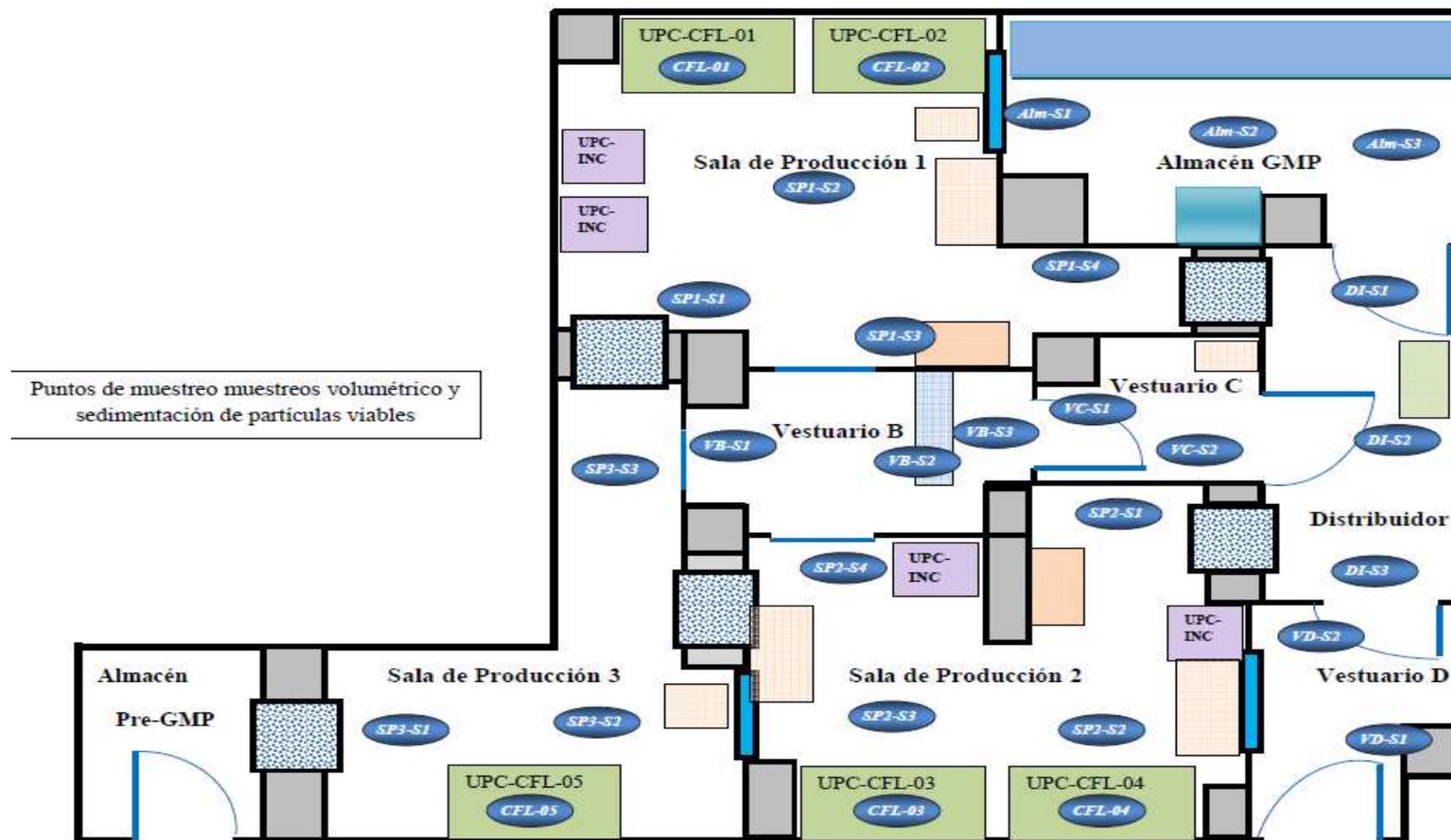
Anexo IX: Puntos de muestreo de superficies semanal tras análisis de riesgos.



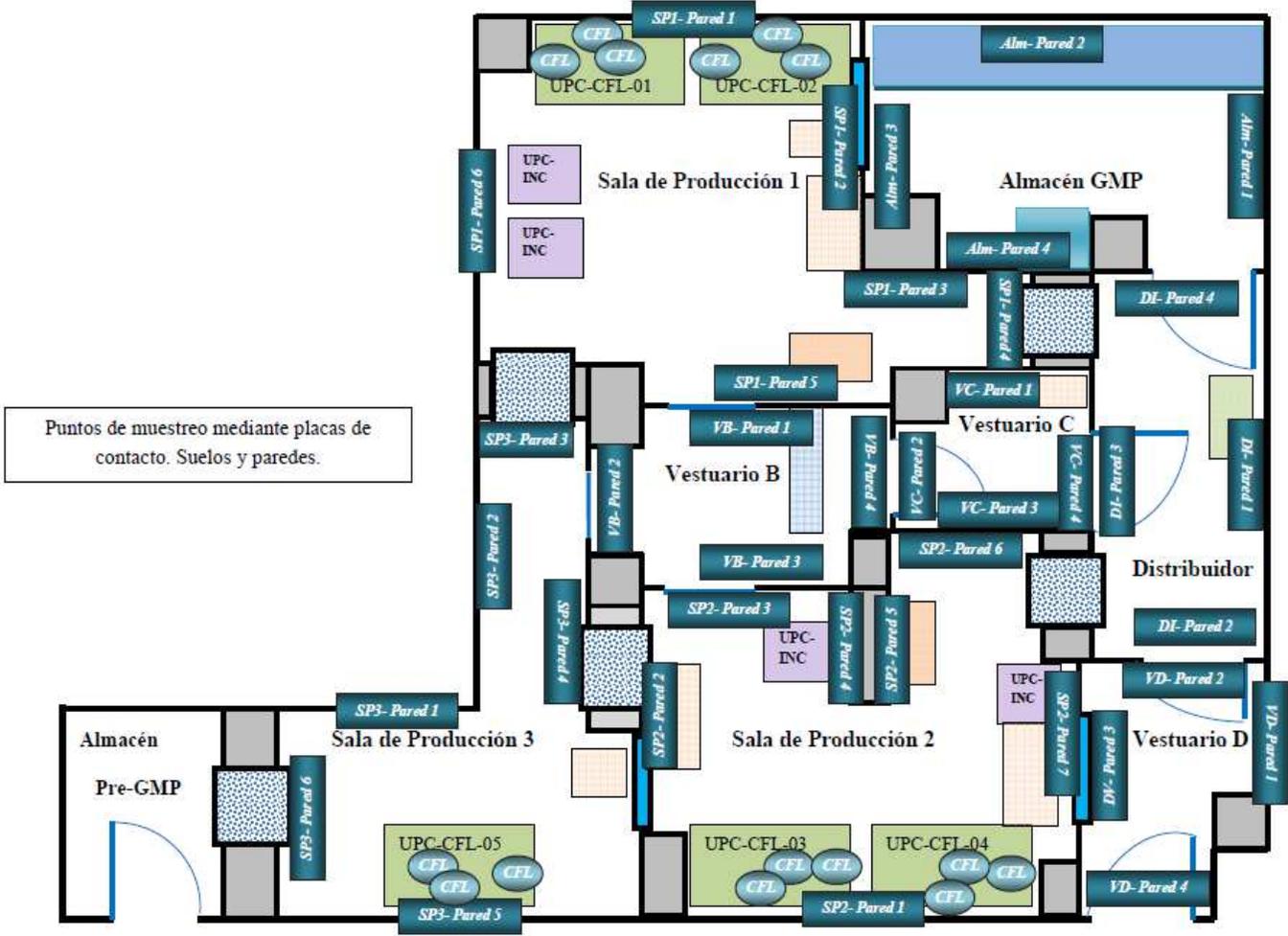
Anexo X: Puntos de muestreo de superficies mensual tras análisis de riesgos.



Anexo XI: Cualificación microbiológica de la instalación. Puntos de muestreo volumétrico y sedimentación de partículas viables



Anexo XII: Cualificación microbiológica de la instalación. Puntos de muestreo de superficies: suelos y paredes.



Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

A. Biocida PH (Peróxido de hidrógeno al 6% en agua purificada)

i. Staphylococcus aureus

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N0/N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,1
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/128	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/256	5 min	150	15750	Si	2,9
	10 min	0	0	No	>7,1
	15 min	0	0	No	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

ii. Micrococcus luteus

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,2
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/128	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/256	5 min	40	4200	Si	3,6
	10 min	0	0	No	>7,2
	15 min	0	0	No	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iii. Escherichia coli

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,0
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/128	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/256	5 min	21	2205	Si	3,6
	10 min	0	0	No	>7,0
	15 min	0	0	No	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iv. Candida albicans

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>6,5
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/128	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/256	5 min	207	21735	Si	2,2
	10 min	101	10605	Si	2,5
	15 min	24	2520	Si	3,1

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

v. Bacillus subtilis

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)	
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)			
1/1	5 min	0	0	No	>6,4	
	10 min	0	0	No		
	15 min	0	0	No		
1/2	5 min	0	0	No		
	10 min	0	0	No		
	15 min	0	0	No		
1/4	5 min	0	0	No		
	10 min	0	0	No		
	15 min	0	0	No		
1/8	5 min	0	0	No		
	10 min	0	0	No		
	15 min	0	0	No		
1/16	5 min	18	1890	Si		3,1
	10 min	0	0	No		>6,4
	15 min	0	0	No		
1/32	5 min	97	10185	Si	2,4	
	10 min	129	13545	Si	2,3	
	15 min	38	3990	Si	2,8	
1/64	5 min	121	12705	Si	2,3	
	10 min	162	17010	Si	2,2	
	15 min	120	12600	Si	2,3	
1/128	5 min	118	12390	Si	2,3	
	10 min	149	15645	Si	2,2	
	15 min	136	14280	Si	2,2	
1/256	5 min	129	13545	Si	2,3	
	10 min	151	15855	Si	2,2	
	15 min	155	16275	Si	2,2	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

vi. Aspergillus niger

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>4,0
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	19	1900	Si	0,7
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	Incontables	Incontables	No	>4
	10 min	33	3300	SI	
	15 min	0	0	No	

B. Biocida AH (Ácido Hipocloroso en agua purificada)

i. Staphylococcus aureus

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,1
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	2	210	Si	4,8
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	21	2205	Si	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	12	1260	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

ii. *Micrococcus luteus*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,2
	10 min	0	0	No	>7,2
	15 min	0	0	No	>7,2
1/2	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	0	0	No	>7,2
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iii. *Escherichia coli*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>6,9
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	0	0	No	>6,9
	15 min	0	0	No	>6,9
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	76	7980	Si	3,1
	15 min	0	0	No	>6,9
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	18	1890	Si	3,7
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iv. *Candida albicans*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>6,5
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	101	10605	Si	2,5
	10 min	39	4095	Si	3,6
	15 min	0	0	No	>6,5
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	135	14175	Si	2,4
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

v. *Bacillus subtilis*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	301	31605	Si	1,9
	10 min	14	1470	Si	3,2
	15 min	0	0	No	>6,4
1/2	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	368	38640	Si	1,8
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

vi. *Aspergillus niger*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10 ml (N)		
1/1	5 min	5	500	Si	1,3
	10 min	0	0	No	>4,0
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	12	1200	Si	0,9
	10 min	22	2200	Si	0,6
	15 min	0	0	No	>4,0
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	28	2800	Si	0,5
	15 min	18	1800	Si	0,7

C. *Biocida AQ (Dióxido de cloro y amonio cuaternario)*

i. *Staphylococcus aureus*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,1
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

1/128	5 min	0	0	No
	10 min	0	0	No
	15 min	0	0	No
1/256	5 min	0	0	No
	10 min	0	0	No
	15 min	0	0	No

ii. *Micrococcus luteus*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,2
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/128	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/256	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iii. *Escherichia coli*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,0
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/128	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/256	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iv. *Candida albicans*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>6,5
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/128	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/256	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

v. *Bacillus subtilis*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>6,4
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/8	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/16	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/32	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/64	5 min	8	840	Si	3,5
	10 min	0	0	No	>6,4
	15 min	0	0	No	>6,4
1/128	5 min	116	12180	Si	2,3
	10 min	29	3045	Si	2,9
	15 min	16	1680	Si	3,2
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

vi. *Aspergillus niger*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>4,0
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	

D. Etanol 70 %

i. *Staphylococcus aureus*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,1
	10 min	0	0	No	>7,1
	15 min	0	0	No	>7,1
1/2	5 min	4	420	No	4,5
	10 min	0	0	No	>7,1
	15 min	0	0	No	>7,1
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	105	11025	Si	3,1
	15 min	91	9555	Si	3,2
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

ii. *Micrococcus luteus*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,2
	10 min	0	0	No	>7,2
	15 min	0	0	No	>7,2
1/2	5 min	0	0	No	>7,2
	10 min	0	0	No	>7,2
	15 min	0	0	No	>7,2
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	121	12705	Si	3,1
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iii. *Escherichia coli*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,0
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	59	6195	Si	3,2
	10 min	0	0	No	>7,0
	15 min	0	0	No	>7,0
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	70	7350	Si	3,1
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

iv. *Candida albicans*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>6,5
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	220	23100	Si	2,2
	10 min	159	16695	Si	2,3
	15 min	21	2205	Si	3,2
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	188	19740	Si	2,2
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

v. *Bacillus subtilis*

No se verificó al no tener el etanol 70 % efecto esporicida.

vi. *Aspergillus niger*

No se verificó al no tener el etanol 70 % efecto esporicida.

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

E. Isopropanol al 70%

vii. Staphylococcus aureus

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,1
	10 min	0	0	No	>7,1
	15 min	0	0	No	>7,1
1/2	5 min	0	0	No	>7,1
	10 min	0	0	No	>7,1
	15 min	0	0	No	>7,1
1/4	5 min	0	0	No	>7,1
	10 min	0	0	No	>7,1
	15 min	0	0	No	>7,1
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

viii. *Micrococcus luteus*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,2
	10 min	0	0	No	>7,2
	15 min	0	0	No	>7,2
1/2	5 min	0	0	No	>7,2
	10 min	0	0	No	>7,2
	15 min	0	0	No	>7,2
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	85	8925	Si	3,2
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

ix. *Escherichia coli*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>7,0
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	90	9450	Si	2,9
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

Anexo XIII. Capacidad bactericida y fungicida de los diferentes biocidas: diluciones máximas y tiempos óptimos de contacto.

x. *Candida albicans*

Dilución	Tiempo contacto	Ufc recuperadas en TSA tras el tiempo de contacto		TSB (turbidez) Inóculo 50 µl	Actividad desinfectante (log N ₀ /N)
		En inóculo de 100 µl	Cálculo de ufc totales en 10,5 ml (N)		
1/1	5 min	0	0	No	>6,5
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/2	5 min	0	0	No	
	10 min	0	0	No	
	15 min	0	0	No	
1/4	5 min	240	25200	Si	2,1
	10 min	170	17850	Si	2,3
	15 min	119	12495	Si	2,4
1/8	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	290	30450	Si	2,0
	15 min	180	18900	Si	2,2
1/16	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	15 min	235	24675	Si	2,1
1/32	5 min	Incontables	Incontables	Si	Sin actividad
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/64	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/128	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	
1/256	5 min	Incontables	Incontables	Si	
	10 min	Incontables	Incontables	Si	
	15 min	Incontables	Incontables	Si	

xi. *Bacillus subtilis*

No se verificó al no tener el isopropanol 70 % efecto esporicida.

xii. *Aspergillus niger*

No se verificó al no tener el isopropanol 70 % efecto esporicida.