

## Evaluación de la carga microbiológica ambiental en áreas destinadas a producción y control de vacunas

### Evaluation of the environmental microbiological burden in vaccine production and control areas

MSc. Alejandro Javier Bottale<sup>I</sup>, Dra. Laura Marisa Riera<sup>II</sup>, Dr. Leon Rabinovitch<sup>III</sup>

<sup>I</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Dr. Julio I. Maiztegui INEVH. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). Buenos Aires, Argentina.

<sup>II</sup> Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA). Buenos Aires, Argentina.

<sup>III</sup> Laboratorio de Fisiología Bacteriana, Fundación Oswaldo Cruz -Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz Pabellón Rocha Lima. Río de Janeiro, Brasil.

---

#### RESUMEN

**Objetivo:** el objetivo del presente trabajo fue contribuir al aseguramiento de la calidad microbiológica de una planta de producción de vacunas, a través de la identificación de la carga microbiológica ambiental y su comportamiento frente a los desinfectantes utilizados de rutina.

**Método:** Se estudió la flora residente de cada área clasificada. Se analizaron muestras de aire tomadas por los métodos volumétricos y sedimentación en placa. Las superficies y vestimenta del personal fueron evaluadas por el método de contacto. Se realizaron identificaciones en género y especie estableciéndose para cada área un Grupo de Microorganismos Indicador formado por microorganismos aislados con una frecuencia superior al 5 %.

**Resultados:** Bioterio: *Staphylococcus spp* (50 %), *Aerococcus spp* (21 %), *Micrococcus spp* (10 %), *Bacillus spp* y Géneros Relacionados (6 %); Cultivos Celulares Normales: *Staphylococcus spp* (48 %), *Micrococcus spp* (34 %), *Bacillus spp* y Géneros Relacionados (13 %); Control de Calidad: *Staphylococcus spp* (50 %), *Micrococcus spp* (27 %), *Kocuria spp* (9 %), *Bacillus spp* y Géneros Relacionados (7%); Producción: *Staphylococcus spp* (50 %), *Micrococcus spp* (17 %), *Kocuria spp* (11 %), *Leuconostoc spp* (8 %), *Bacillus spp* y Géneros Relacionados (6 %). El grupo indicador para la Unidad de Producción se identificó como *Staphylococcus spp* (49,5 %), *Micrococcus spp*. (23,0 %), *Bacillus spp* y Géneros Relacionados (8,1 %). El desafío de

los desinfectantes en uso con cepas del grupo de microorganismos indicadores evidenció en general una acción microbicida alta.

**Conclusión:** los resultados proporcionan información sobre la carga microbiológica del ambiente que será de utilidad tanto para la comprensión del ingreso y circulación de microorganismos como para la implementación de medidas para prevenir la contaminación microbiana, aspectos críticos en la fabricación de vacunas seguras, puras y eficaces.

**Palabras clave:** monitoreo microbiológico ambiental, eficacia de desinfectantes, aseguramiento de calidad, producción de vacunas.

---

## ABSTRACT

**Objectives:** the objective of this study was to support microbiological quality assurance in a vaccine production plant through identification of environmental microbiological charge and its behavior with routine disinfectants.

**Methods:** the existing flora of each classified area was studied. Air samples taken by volumetric and plate sedimentation methods were analyzed. Surfaces and the gown of the staff were assessed by contact method. Genera and species were identified, thus setting a Group of Indicator Microorganisms made up of microorganisms that were isolated at a rate greater than 5% for each facility.

**Results:** animal Facility: Staphylococcus spp (50 %), Aerococcus spp (21 %), Micrococcus spp (10 %), Bacillus spp and related genera (6 %); Normal Tissue Culture Laboratory: Staphylococcus spp (48 %), Micrococcus spp (34 %), Bacillus spp and related genera (13 %); Quality Control Laboratory: Staphylococcus spp (50 %), Micrococcus spp (27 %), Kocuria spp (9 %), Bacillus spp and related genera (7 %); Production: Staphylococcus spp (50 %), Micrococcus spp (17 %), Kocuria spp (11 %), Leuconostoc spp (8 %), Bacillus spp and related genera (6 %). The Group of Indicator Microorganisms for the Production Unit was identified as Staphylococcus spp (49.5 %), Micrococcus spp (23 %) and Bacillus spp and related genera (8.1%). The regularly used disinfectants for strains from the Group of Indicator Microorganisms showed a high microbicidal efficacy.

**Conclusion:** the results provide information about the environmental bioburden, which will be useful for the understanding of the microbial entry points and spreading and the implementation of measures to prevent microbial contamination, so critical for manufacture of safe, pure and effective vaccines.

**Keywords:** environmental microbiological monitoring, disinfectant efficacy, quality assurance, vaccine production.

---

## INTRODUCCIÓN

Los laboratorios farmacéuticos que elaboran productos estériles deben utilizar ambientes microbiológicamente controlados. Ciertos productos, que por sus características propias no toleran un proceso de esterilización final, requieren un procedimiento comprobadamente aséptico para su elaboración.

---

El control de partículas se logra operando en áreas clasificadas. Las mismas son espacios diseñados para minimizar la introducción, generación y retención de contaminantes. Para ello se requieren sistemas de acondicionamiento y filtración del aire, presiones diferenciales, programas de limpieza y desinfección, vestimenta adecuada, personal entrenado y acciones correctivas inmediatas cuando se exceden los límites de contaminantes permitidos. Existen regulaciones específicas de aplicación a las áreas clasificadas en relación con los procesos de elaboración en la industria farmacéutica.<sup>1,2,3,4</sup> La clasificación de las áreas, según el destino de las mismas, está vinculada a la cantidad máxima permitida de partículas totales. La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), autoridad regulatoria argentina, clasifica las áreas limpias en grados, según la calidad del aire.

- Grado A: Es el área para operaciones de alto riesgo como llenado y preparaciones asépticas. Normalmente tales condiciones son provistas por una estación de trabajo de flujo laminar.
- Grado B: Es el área que rodea a la de grado A en llenado y preparaciones asépticas.
- Grado C y D: Son las áreas limpias para llevar a cabo los pasos menos críticos de la elaboración de productos estériles.

En cuanto a la cantidad de partículas viables, las normas vigentes solo recomiendan ciertos límites para las áreas clasificadas.

El monitoreo ambiental, requerimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación, provee información de la calidad del ambiente durante la manufactura.<sup>1,5</sup> El estado de control de las áreas de la unidad de producción de vacuna es rutinariamente verificado a través de un programa de monitoreo ambiental para partículas viables y no viables, diferenciales de presión, temperatura y humedad relativa. Además, evidencia la adecuación del programa de limpieza y desinfección. El control de partículas viables en cada laboratorio productor requiere de las evaluaciones de la calidad microbiológica del aire y de las superficies, incluyendo las vestimentas de los operadores.<sup>6,7,8,9</sup> El conocimiento de la flora nativa de microorganismos es una herramienta importante para detectar el origen de eventuales contaminaciones.

Las fuentes de contaminación en un área clasificada pueden ser múltiples.<sup>10,11,12</sup> Es importante mencionar, según datos recopilados de la *FDA (Food and Drug Administration)*, que el 78 % de los retiros de productos farmacéuticos estériles del mercado de los Estados Unidos, entre los años 1998 y 2006 se produjo por falta de garantía de esterilidad.<sup>13</sup>

Por otra parte, la desinfección de áreas limpias es un proceso crítico en la elaboración de productos estériles, debiendo garantizarse la eficacia de la misma mediante la evaluación de los desinfectantes. Para evaluar la eficacia microbicida de un desinfectante se recomienda: realización de pruebas de dilución de uso, pruebas de desafío en superficies y comparación estadística de la frecuencia de los aislamientos y números de microorganismos antes y después de la utilización de un nuevo desinfectante. Esta información es necesaria para validar las etapas críticas del proceso. Además, generalmente no se dispone de instrucciones de uso para la industria farmacéutica.<sup>14,15</sup>

El objetivo principal de este trabajo fue contribuir al aseguramiento de la calidad microbiológica de una planta de producción de vacunas, mediante la evaluación de áreas destinadas a producción y control de calidad. Los objetivos particulares

fueron identificar los microorganismos indicadores para cada área clasificada y determinar la eficacia de los desinfectantes utilizados frente a los microorganismos aislados.

## MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Producción de Vacuna del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) "Dr. Julio I. Maiztegui", de la República Argentina, habilitado como productor de vacunas virales atenuadas de uso humano.

### MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE LAS ÁREAS CLASIFICADAS

Se realizó el monitoreo de la calidad microbiológica de los ambientes de cada área clasificada (grados A, B, C o D destinadas a distintas operaciones involucradas en la producción y control de vacunas), Gabinetes de Seguridad Biológica (GSB) Clase II Tipo A-2 y vestimenta, para conocer la flora nativa. La toma de muestras para la evaluación se realizó en el período marzo 2009 - noviembre 2010, siguiendo la metodología recomendada por la Farmacopea Argentina.<sup>16</sup>

### ÁREAS SELECCIONADAS PARA LA EVALUACIÓN Y CANTIDAD DE PERSONAS QUE SE DESPEÑAN EN LAS MISMAS

Se seleccionaron áreas destinadas a las operaciones críticas en cuanto a los requisitos de calidad microbiológica:

- Laboratorios de Producción de Vacuna: 9 personas
- Laboratorios de Producción de Cultivos Celulares Normales y GSB: 11 personas
- Laboratorios de Control de Calidad y GSB: 6 personas
- Bioterio de Cría de Animales SPF (*specific pathogen free*): 2 personas

### MONITOREO DE SUPERFICIES Y VESTIMENTA

La toma de muestra en superficies y ropa se realizó por contacto mediante la aplicación estandarizada de placas RODAC (*Replicate Organisms Detection and Counting*) de 55 mm de diámetro, y placas de *Petri* de 90 mm de diámetro para la impresión de los dedos enguantados de ambas manos, inmediatamente después de finalizado el trabajo. En ambos tipos de placas se utilizó medio de cultivo microbiológico *Agar D/E Neutralizing (Difco)*, preparadas según instrucciones del fabricante. Las placas tuvieron un plazo de validez de 20 días conservadas entre 2 °C a 8 °C.

El monitoreo de las superficies se realizó antes y después de la limpieza incluyendo pisos, paredes, puertas y mesadas.

La colección de muestras de la vestimenta estéril se realizó al personal involucrado en tareas de producción de vacuna, producción de cultivos celulares normales, ejecución de ensayo de esterilidad, cría y cuidado de ratones SPF.

## MONITOREO DE AIRE

Las muestras de aire fueron tomadas mediante dos métodos:<sup>17</sup>

· Método activo: método volumétrico por impacto sobre placa con Agar con equipo colector volumétrico air IDEAL 3P (*Biomerieux*), con un caudal de aspiración calibrado de 100 L/min y una velocidad de impacto inferior a 20 m/s. El volumen muestreado fue de 1000 litros.

· Método pasivo: método de sedimentación sobre placa de agar, con un tiempo de exposición no mayor a cuatro horas.

En todas las áreas se tomaron muestras mediante el método activo en reposo y en proceso. Por el método pasivo se tomaron muestras de aire dentro de los GSB durante los procesos y en las áreas Grado A y B de producción de vacuna.

Para ambos métodos se utilizaron placas de *Petri* de 90 mm de diámetro con Agar Tripticosa Soja (*Difco*). Todos los medios de cultivos microbiológicos constaron de certificado de análisis. Los mismos fueron preparados siguiendo rigurosamente las instrucciones del fabricante.

## INCUBACIÓN Y RECuento

Las placas utilizadas en la toma de muestras fueron llevadas de inmediato al Laboratorio de Microbiología de Control de Calidad, para su incubación en estufa a 30 - 35°C por 48 horas para el recuento de bacterias, más 72 horas a 20 - 25°C para hongos.<sup>6</sup> Los recuentos fueron registrados en UFC (unidades formadoras de colonias).

## IDENTIFICACIÓN

La identificación bioquímica de las colonias bacterianas aisladas se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad con metodología de rutina la cual incluye la utilización del equipo *Vitek 2* (*Biomerieux*). Algunas de estas cepas, principalmente del Género *Bacillus*, microorganismos de difícil identificación en especie, fueron enviadas al Laboratorio de Fisiología Bacteriana del Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ-Brasil para confirmar su identidad.<sup>18-20</sup>

Los microorganismos aislados e identificados fueron criopreservados como parte de un banco de microorganismos ambientales contaminantes de las áreas clasificadas.

## DESAFÍO DE DESINFECTANTES EN USO FRENTE A MICROORGANISMOS AISLADOS

Se realizó un ensayo en suspensión cuantitativo en el que se utilizaron cepas aisladas frecuentemente en las áreas clasificadas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Micrococcus luteus* y *Lysinobacillus sphaericus* (ex-*Bacillus sphaericus*).

Se colocaron dos volúmenes de una suspensión densa del microorganismo (aproximadamente  $10^6$ - $10^7$  células viables/ml) en contacto con una solución de desinfectante de concentración determinada y con agua purificada estéril en una relación de volúmenes 50/50. En este último se recuperó el microorganismo sin exponer. El tiempo de exposición fue de 1 minuto, tiempo mínimo en los procedimientos de limpieza y desinfección de superficies. Luego de la exposición, se realizó el recuento en placa de bacterias viables sobre medio de cultivo Agar D/E

Neutralizing con inhibidores de los componentes químicamente activos de los desinfectantes. Los inhibidores de este medio microbiológico son: Tioglicolato de Sodio (1,0 g/L), Tiosulfato de Sodio (6,0 g/L), Bisulfito de Sodio (2,5 g/l), Polisorbato 80 (5,0 g/L), Lecitina (7,0 g/L).

Se evaluaron los siguientes desinfectantes en las concentraciones habituales de uso: Hipoclorito de Sodio (61,4 g/L), marca *Química Cenci*, Lote INEVH # 155, 2000 ppm; Amonio Cuaternario (mezcla de Cloruros de Alquil Dimetil Bencilamonio 10 g/100 ml), marca *Niesser*, Lote # 10-135, en dilución propuesta por el fabricante (1/1000) y Alcohol etílico 96° v/v, marca *Purocol*, Lote # 966, 70° v/v.

Se calculó la eficacia microbicida de la siguiente forma:

A = N° de bacterias recuperadas sin exponer

B = N° de bacterias recuperadas con exposición

Se consideró como requisito una eficacia del 99,999 %, equivalente a una reducción de 5 unidades logarítmicas de la población de células viables.<sup>14</sup>

## RESULTADOS

### GRUPOS DE MICROORGANISMOS INDICADORES

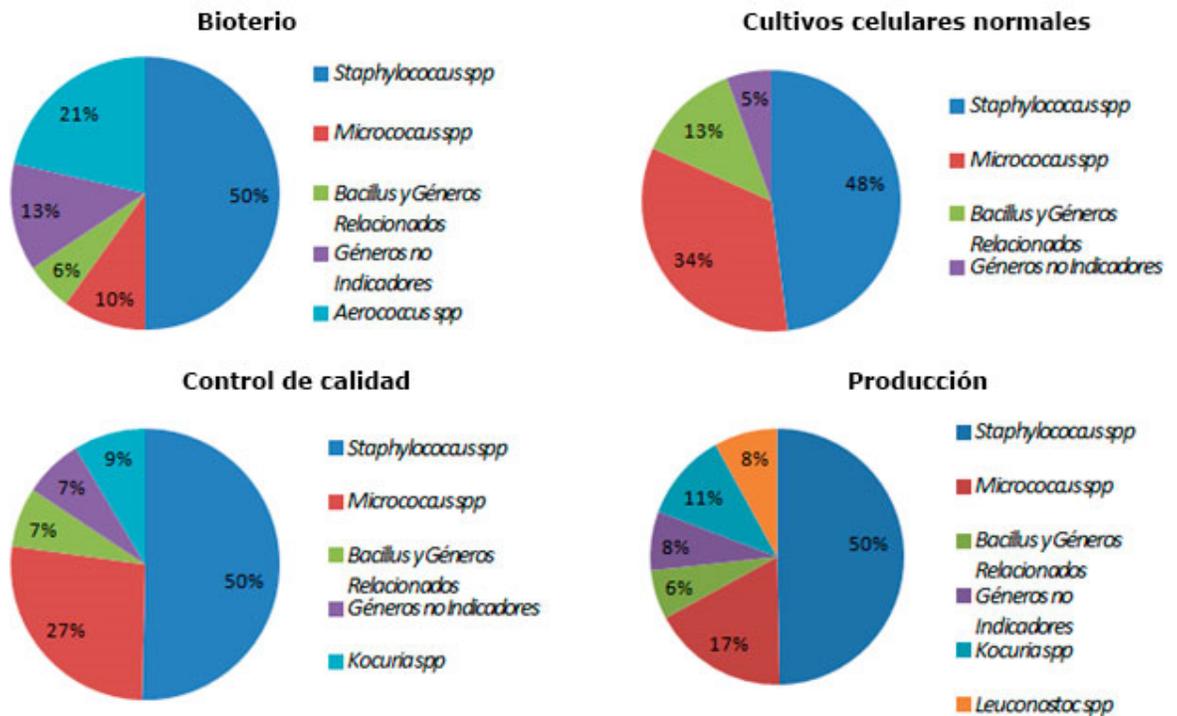
Se determinó la frecuencia de aparición de microorganismos para cada área clasificada de la Unidad de Producción (Figura 1). Se analizaron 126 muestras de Bioterio, 140 de Cultivos Celulares, 226 de Control de Calidad y 241 de Producción, de las cuales se obtuvo 70, 125, 127 y 161 aislamientos microbiológicos respectivamente. Se definió Grupo de Microorganismo indicadores (GMI) al integrado por microorganismos que estuvieron presentes en cada área con una frecuencia mayor al 5 %. El resto representó el Grupo de Microorganismos No Indicadores (GMNI). Los aislamientos fueron identificados en género y especie, excepto los hongos filamentosos (Tabla 1).

Luego del análisis global de todos los aislamientos provenientes de las distintas áreas clasificadas, se observa que los géneros de microorganismos más frecuentes en la Unidad de Producción fueron *Staphylococcus spp* (49,5 %), *Micrococcus spp* (23,0 %) y *Bacillus spp* y Géneros Relacionados (8,1 %) (Figura 2), resultados coincidentes con otros trabajos publicados.<sup>22</sup> El género *Staphylococcus spp* fue el más frecuentemente aislado en todas las áreas.

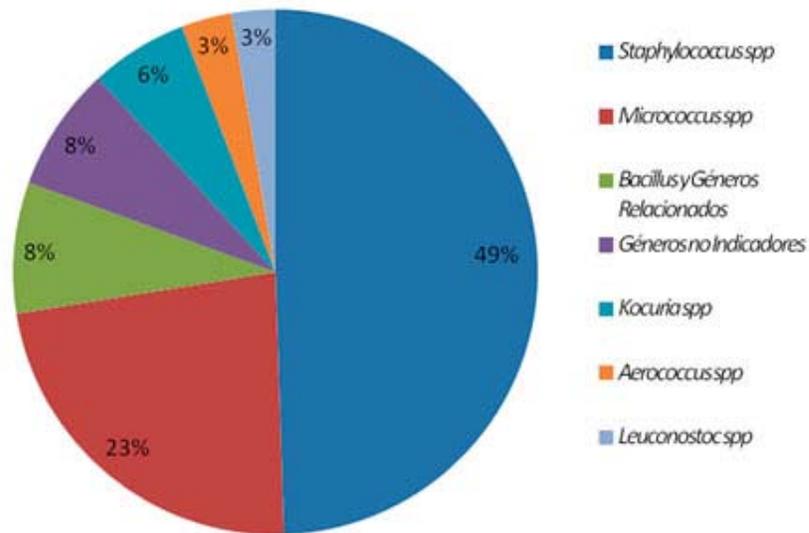
**Tabla 1.** Evaluación de la eficacia microbicida de desinfectantes en uso frente a microorganismos aislados.

	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Recuperación sin exposición	$3,9 \times 10^7$ ufc	$1,7 \times 10^6$ ufc	$1,9 \times 10^5$ ufc	$7,1 \times 10^7$ ufc
Recuperación en Amonio Cuaternario 1/1000	$1,5 \times 10^2$ ufc	$1,1 \times 10^3$ ufc	$6,5 \times 10^2$ ufc	$1,5 \times 10^3$ ufc
Eficacia	99,999 %	99,935 %	99,658 %	99,998 %
Recuperación en Hipoclorito de Sodio 2000 ppm	$1,5 \times 10^2$ ufc	$7,5 \times 10^1$ ufc	ND	$1,5 \times 10^1$ ufc
Eficacia	99,999 %	99,996 %	100 %	99,999 %
Recuperación en Alcohol etílico 70°v/v	ND	ND	ND	$1,7 \times 10^4$ ufc
Eficacia	100 %	100 %	100 %	99,976%

ND: No detectado.



**Fig. 1.** Frecuencia de géneros de microorganismos aislados en cada área clasificada.



**Fig. 2.** Frecuencia de géneros de microorganismos aislados en la Unidad de Producción.

Se contabilizó la cantidad de placas con presencia de hongos filamentosos sobre el total de placas utilizadas en los monitoreos ambientales realizados en cada área de la Unidad de Producción. Los recuentos fueron: Bioterio (ausencia/126 totales), Cultivos Celulares Normales (presencia 3/299 totales) (1,0 %), Control de Calidad (presencia 27/286 totales) (9,4 %) y Producción (presencia 13/309 totales) (4,2 %).

#### VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE DESINFECTANTES

En la Tabla 2 se resumen los recuentos en UFC de las suspensiones con cepas pertenecientes al GMI sin exponer y expuestas durante un minuto a cada desinfectante de uso habitual en las áreas clasificadas de la Unidad de Producción. Se observa en general una alta eficacia microbicida para cada desinfectante evaluado.

**Tabla 2.** Especies aisladas en las áreas clasificadas que componen la Unidad de Producción.

Géneros Aislados	Especies Bioterio	Especies CCN	Especies CCAL	Especies Producción
	GMI			
<i>Staphylococcus spp</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>S. cohnii</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. spp</i>	<i>S. hominis</i>
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>
	<i>S. hominis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>

	<i>S. warneri</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. spp</i>
	<i>S. spp</i>	<i>S. spp</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. caprae</i>
	<i>S. capitis</i>		<i>S. cohnii</i>	<i>S. saprophyticus</i>
	<i>S. equorum</i>		<i>S. lentus</i>	<i>S. capitis</i>
			<i>S. aureus</i>	<i>S. cohnii</i>
			<i>S. xylosus</i>	
<i>Micrococcus spp</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. luteus</i>
<i>Bacillus spp</i> y Géneros Relacionados	<i>Bacillus vallismortis</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>Bacillus spp</i>
	<i>Bacillus cereus</i> <i>Geobacillus spp</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Lysinibacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
		<i>sphaericus</i> <i>Bacillus cereus</i>	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus pumilus</i>
			<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	<i>Bacillus magaterium</i> <i>Virgibacillus proomii</i>
	GMNI			
<i>Kocuria spp</i>	<i>K. rosea</i>	<i>K. kristinae</i>	<i>K. rosea</i>	<i>K. kristinae</i>
	<i>K. kristinae</i>	<i>K. rosea</i>	<i>K. kristinae</i>	<i>K. varians</i>
		<i>K. varians</i>		<i>K. rosea</i>
<i>Aerococcus spp</i>	<i>A. viridans</i>	ND	ND	<i>A. viridans</i>
<i>Leuconostoc spp</i>	<i>L. mesenteroides</i>	ND	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Dermacoccus spp</i>	<i>D. nishinomiyaensis</i>	ND	<i>D. nishinomiyaensis</i>	<i>D. nishinomiyaensis</i>
<i>Granulicatella spp</i>	<i>G. elegans</i>	<i>G. adiacens</i>	<i>G. elegans</i>	<i>G. elegans</i>
				<i>G. adiacens</i>
<i>Alloiococcus spp</i>	<i>A. otitis</i>	ND	ND	<i>A. otitis</i>
<i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	ND	ND	ND
<i>Globicatella spp</i>	ND	ND	<i>G. sulfidifaciens</i>	ND
<i>Kytococcus spp</i>	ND	ND	<i>K. sedentarius</i>	ND

ND: No Detectado; CCN: Cultivos Celulares Normales; CCAL: Control de Calidad; GMI: Grupo de Microorganismos Indicadores; GMNI: Grupo de Microorganismos No Indicadores

## DISCUSIÓN

La identificación de los microorganismos hallados permite la asociación a posibles fuentes de contaminación. Por otra parte, la detección de un microorganismo no habitual o el cambio en la distribución de frecuencias estaría alertando sobre una posible falla de los sistemas que mantienen las áreas clasificadas bajo control.

Las especies del género *Staphylococcus spp* y otros cocos Gram-positivos son residentes habituales de la piel y mucosas de las personas. El hecho de ser éstos los microorganismos aislados con mayor frecuencia en todos los ambientes de la Unidad de Producción muestra la importancia de la vestimenta, su técnica de colocación y el entrenamiento continuo del personal que desarrolla actividades críticas. Por otro lado, la baja frecuencia de microorganismos aislados ligados al polvo y suelo como hongos filamentosos y *Bacillus spp* y Géneros relacionados indican una elevada eficacia de los sistemas de filtración de aire y de los procedimientos de limpieza y desinfección.

Las contaminaciones reportadas tanto en productos como durante validaciones de llenado aséptico, permiten relacionarlas con el GMI definido en el presente trabajo.

Se han aislado, como contaminantes de productos intermedios procesados en el ambiente de un GSB de Clase II Tipo A – 2 certificado equivalente a un área Grado A, *Staphylococcus haemolyticus* y *Micrococcus luteus*, ambos cocos Gram-positivos, como únicas especies en cada caso. Puede observarse que son microorganismos que se encuentran identificados en el GMI, con altas frecuencias de aislamiento. Este hallazgo coincide con publicaciones anteriores,<sup>21</sup> donde se muestra a estos géneros como dos de los tres principales que tienen incidencia como contaminantes de las áreas de producción y que tienen como origen a los individuos. Es posible que la vestimenta utilizada por el personal no esté actuando en su función de barrera de forma eficiente. Los resultados obtenidos del monitoreo microbiológico ambiental y de la indumentaria estéril, y el entrenamiento continuo del personal en la técnica de colocación de vestimenta es sin duda una oportunidad de mejora para la realización de técnicas asépticas.

Otros microorganismos causales de contaminación, hallados en validaciones de llenado aséptico, han resultado *Bacillus spp* y Géneros Relacionados, *Kocuria rosea*, *Kocuria varians*, especies aisladas con alta frecuencia en los Laboratorios de Producción.

Todos los microorganismos contaminantes aislados de productos o en validaciones de llenado aséptico que han provocado desvíos coinciden con géneros / especies definidos en el GMI.

Se observa una mayor presencia de hongos filamentosos en los Laboratorios de Control de Calidad (9,4 %). Este hallazgo podría deberse al direccionamiento del flujo de aire ya que estos laboratorios presentan características distintas a los laboratorios de Producción y Bioterio. Las presiones diferenciales hacen que el aire ingrese desde el pasillo de circulación a las áreas de trabajo. De esta forma, funcionan como ambientes de Nivel III de biocontención, brindando protección al

exterior de microorganismos infecciosos o potencialmente infecciosos. El flujo de aire desde el pasillo de circulación al interior del área podría acarrear mayor cantidad de partículas transportadoras de microorganismos.

Los programas de limpieza y desinfección, como se mencionó anteriormente, también son de suma importancia para mantener un área limpia bajo control microbiológico.<sup>22</sup> Los desinfectantes de uso en estas áreas deben ser de eficacia probada no solo frente a cepas de referencia sino también frente a cepas de la flora habitual de los ambientes, las que pueden presentar una respuesta diferente.

Los desinfectantes probados mostraron en general, un alto nivel de eficacia, con una disminución de por lo menos cinco logaritmos en la recuperación de células viables, equivalente al 99,999 % de eficacia luego de la exposición al desinfectante. El Hipoclorito de Sodio 2 000 ppm, mostró una eficacia entre 99,999 % y 100 % de las células viables de todos los microorganismos probados excepto para el *Micrococcus luteus* (99,996 %). El Amonio Cuaternario 1/1 000, fue un buen desinfectante solo frente al *Staphylococcus epidermidis* (99,999 %), pero no fue así frente al *Micrococcus luteus* (99,935 %), *Lysinibacillus sphaericus* (99,658 %) y *Staphylococcus haemolyticus* (99,998 %). El alcohol etílico 70° v/v, demostró ser altamente efectivo (100 %), con el *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* y *Lysinibacillus sphaericus*, pero no con el *Staphylococcus haemolyticus* (99,976 %).

Se debe tener en cuenta, que el tiempo de exposición fue de solo un minuto. En los casos de una actividad desinfectante intermedia, podría ser necesario utilizar tiempos de exposición más prolongados.

Los resultados de los recuentos de superficies para todas las áreas de la Unidad de Producción, muestran un importante descenso en las muestras pos limpieza. Esto indica no solo una alta efectividad de los desinfectantes en uso como fue observado en general contra los microorganismos del GMI, sino también una alta efectividad microbicida debida a los procedimientos de limpieza y desinfección aplicados rutinariamente por los operarios.

Como es de esperar que las áreas no sean libres de microorganismos, el mantenimiento de una biocarga mínima permitirá fortalecer el Programa de Aseguramiento de la Calidad desde la prevención para anticipar situaciones que se alejen de las condiciones habituales, evitando tendencias que pongan en riesgo la calidad del producto.

Los resultados proporcionan información sobre la carga microbiológica del ambiente que será de utilidad tanto para la comprensión del ingreso y circulación de microorganismos como para la implementación de medidas para prevenir la contaminación microbiana, aspectos críticos en la fabricación de vacunas seguras, puras y eficaces.

Se puede observar en los resultados y como fue comentado en este trabajo, que los individuos son la principal fuente de diseminación de partículas transportadoras de microorganismos. Esto debe ser considerado para restringir la circulación de personal a lo estrictamente necesario principalmente en los lugares donde se desarrollan técnicas asépticas y el nivel de contaminantes debe ser bajo. Por esta razón se consideran prioritarios los entrenamientos de colocación de indumentaria estéril y su calificación.

Los microorganismos contaminantes de las distintas áreas clasificadas deben ser aislados, identificados y criopreservados. La formación de un banco de cepas habituales permite su utilización para desafiar desinfectantes en uso, procesos de

esterilización, propiedades promotoras de crecimiento de medios de cultivos microbiológicos y validaciones de ensayos de esterilidad.

Se debería ampliar las pruebas de desinfectantes, utilizando esporas obtenidas de microorganismos del género *Bacillus* o Géneros Relacionados aislados de las áreas clasificadas de la Unidad de Producción, así como también, incorporar un agente esporicida para su evaluación.

El trabajo realizado brinda las herramientas necesarias para proporcionar una guía a todos los laboratorios que integran una Unidad de Producción de Vacunas tendiente a colaborar con la mejora continua en el sostenimiento de las áreas bajo estricto control microbiológico. La verificación continua de los estándares establecidos por normas nacionales e internacionales y de estándares internos producto del estudio realizado, garantiza que las áreas clasificadas permanezcan bajo control con el consecuente impacto en la calidad y seguridad de los procesos y de los productos destinados a la población.

## Agradecimientos

Los autores del trabajo desean expresar su agradecimiento a los señores Carina Paz, Alejandro Raggio, Florencia Cantore, Gisele Lázzari y Nahuel Martínez del Laboratorio de Control de Calidad del INEVH por la colaboración indispensable para el desarrollo de las prácticas microbiológicas, al personal del Laboratorio de Cultivos Celulares Normales y Bioterio del INEVH por su colaboración en las tomas de muestras. Asimismo agradecen a las autoridades del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" – INEVH y de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud ANLIS por el financiamiento del mismo en el marco de la carrera de Maestría en Biología Molecular y Celular organizada por ANLIS-FIOCRUZ y del proyecto de producción y control de Vacuna Candid # 1, en el cual impactan los resultados del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de Salud. Argentina. Lineamientos generales de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos. Disposición N° 2819/04; 2004.
2. FDA, Guidance for Industry. Sterile Drug Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice, US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Office of Regulatory Affairs; 2004.
3. EMA. Guide To Good Manufacturing Practice, Revision To Annex 1. European Agency of Medications. European Union; 2003.
4. The International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated controlled environments. Part 1: Classification of air cleanliness. International Standard ISO 14644-1:1999(E).

5. World Health Organization. Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities. Geneve: 3<sup>rd</sup> Draft; 2010.
6. United States Pharmacopeia. Evaluación microbiológica de cuartos limpios y otros ambientes controlados. Compendios de Normas Oficiales. Ed. N° 33; 2010.
7. The International Organization for Standardization. Cleanrooms as associated controlled environments-Biocontamination control Part 1: General principles and methods. International Standard 1st Ed. ISO 14698-1:2003(E).
8. The International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control. Part 2: Evaluation and interpretation of biocontamination. Technical Corrigendum 1. International Standard ISO 14698-2:2003/Cor.1:2004(E).
9. Sutton S. Qualification of an Environmental Monitoring Program-1. Selection/Justification of Sample Sites. Pharm Microbiol Forum (PMF) Newsletter. 2008; 14(8):2-8.
10. Ljungqvist B, Reinmüller B. Predicted Contamination Levels in Cleanrooms When Cleanroom-Dressed People Are the Contamination Source . Pharm Technol; 2006.[cited 2014 feb 08] Disponible en:  
<http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Aseptic+processing/Predicted-Contamination-Levels-incleanroomsWhenCI/ArticleStandard/Article/detail/322983>
11. Ljungqvist B, Reinmüller B. Aseptic Production, Gowning Systems and Airborne Contaminants. Pharm Technol (suppl); 2005[cited 2014 oct 09] Disponible en:  
<http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/data/articlestandard//pharmtech/2005/160408/article.pdf>
12. Whyte W, Hejab M. Particle and microbial airborne dispersion from people. Euro J Parenteral & Pharm Sci; 2007;12(2):8.
13. Jiménez L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. PDA J Pharm Sci Technol [Review]. 2007;61(5):17.
14. AENOR. Asociación Española de Normalización y Certificación. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos. Norma española UNE-EN 1040:2006.
15. Rutala W. Disinfection, Sterilization, and Antisepsis - Principles and Practices. In: Healthcare Facilities. Washington DC; Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc; 2001; 233 pp.
16. Farmacopea Argentina. Buenas prácticas de fabricación para elaboradores, importadores / exportadores de medicamentos. Anexo 1-elaboración de medicamentos estériles. Séptima edición, Volumen 1; 2003.
17. Whyte W. Collection efficiency of microbial methods used to monitor cleanrooms. Euro J Parenteral & Pharm Sci. 2005;10(2):5.
18. Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to

*Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Internat J. Syst Evol Microbiol.* 2007;57: 1117-1125.

19. Gordon RE, Haynes WC, Pang CHN. The Genus *Bacillus*. U.S. Department of Agriculture Washington, D.C., Agriculture Handbook # 427; 1973.

20. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci. In Claus, D Berkeley, R.C. W. (org). *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986; cap 13:1104-1139.

21. Agostini-Utescher CL, Franzolin MR, Trabulsi LR (in memoriam), Gambale V. Microbiological Monitoring of Clean Rooms in Development of Vaccines. *Braz J Microbiol.* 2007;38: 710-716.

22. Glasel J. The All-important Fine Details Underlying an Effective Cleaning and Disinfection Program. *Pharm Microbiol Forum (PMF) Newsletter.* 2009;15(7):2-9.

Recibido: 1 de mayo de 2014

Aprobado: 7 de julio de 2014

*Alejandro Javier Bottale* Monteagudo 2510, (2700) Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Correo de contacto: [abottale@anlis.gov.ar](mailto:abottale@anlis.gov.ar)