

Establecimiento de límites microbiológicos internos para áreas clasificadas Grado D

Establishing internal microbiological limits for D grade-classified areas

Alejandro Javier Bottale, Laura Marisa Ceferina Riera

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" INEVH - ANLIS. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA). Argentina

RESUMEN

Objetivo: contribuir al aseguramiento de la calidad microbiológica de una planta de producción de vacunas, a través del establecimiento de límites internos de alerta y de acción para sus áreas clasificadas Grado D.

Métodos: se estudió la microbiota residente de cada área clasificada Grado D. Se analizaron muestras de aire tomadas por el método volumétrico. Las superficies e indumentaria del personal fueron evaluadas por el método de contacto. Los recuentos de microorganismos fueron analizados estadísticamente para la determinación de los límites de alerta y de acción.

Resultados: se establecieron los límites de alerta y de acción microbiológicos para cada área clasificada Grado D de la planta de producción del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas basados en la determinación de los rangos habituales de trabajo. Se establecieron límites, como en el caso de guantes pos trabajo para un área Grado D, donde la norma no los define.

Conclusiones: se mostró concordancia con los límites recomendados por la autoridad regulatoria nacional ANMAT y proporcionó información sobre la carga microbiológica de los ambientes clasificados Grado D, 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; límites de alerta y de acción; producción y control de vacunas.

ABSTRACT

Objective: to contribute to ensuring the microbiological quality of a vaccine manufacturing plant through the establishment of internal microbiological alert and action limits for their grade D classified areas.

Methods: the resident microbiota of each grade D classified area was studied. Air samples taken by the volumetric method were analyzed. The surfaces and the staff's gowning were evaluated by the contact method. The microorganism counts were statistically analyzed to determine the alert and action limits.

Results: the microbiological alert and action limits have been established for each Grade D classified area of the production plant of the National Institute of Human Viral Diseases, based on the determination of the usual working ranges. Limits were set, as in the case of gloves after work for a Grade D area, where the standard does not define them.

Conclusions: the results generally agreed with the limits recommended by the national regulatory authority ANMAT, and additionally, this study provided information on the microbiological flora of grade D classified environments, which will be useful for both understanding the entrance and circulation of microorganisms and implementing measures to prevent biocontamination, which are critical aspects in the manufacture of effective, pure and safe vaccines.

Keywords: environmental microbiological monitoring; alert and action limits; production and control of vaccines.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de niveles bajos de contaminación en los ambientes donde se desarrollan actividades de producción y control en la industria farmacéutica es un factor crítico para asegurar la calidad de los productos, principalmente en elaboraciones mediante procesos asépticos sin esterilización final.¹ Esta condición, es válida también para los ambientes en los que se realizan controles de productos estériles, como por ejemplo el *test* de esterilidad, donde se deben minimizar los riesgos que puedan ocasionar un falso resultado positivo.^{2,3} Para estas actividades se cuenta con áreas clasificadas que son espacios en los cuales se controla la concentración de partículas totales en el aire.⁴ Estas áreas deben diseñarse de manera que minimicen la introducción, generación y retención de contaminantes. La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), autoridad regulatoria argentina, clasifica las áreas limpias en Grados según la calidad del aire.⁵ El área para operaciones de alto riesgo como llenado y preparaciones asépticas es Grado A. Normalmente tales condiciones son provistas por una estación de trabajo de flujo laminar. El área que rodea a la de Grado A en llenado y preparaciones asépticas se define como Grado B. Los Grados C y D son las áreas limpias para llevar a cabo los pasos menos críticos de la elaboración de productos estériles. En este artículo se evalúan las áreas Grado D, que poseen una especificación para su clasificación de 3 500 000 partículas entre 0,5 y 5,0 μm y 20 000 partículas $>5,0 \mu\text{m}$ por metro cúbico en reposo y no definido para el estado de proceso.

En la planta de producción del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH) se elabora una vacuna a virus vivo atenuado llamada "Candid # 1", desarrollada a partir de una cepa atenuada de virus Junín, utilizada para la prevención de la Fiebre Hemorrágica Argentina.^{6,7} El INEVH cuenta con áreas clasificadas Grado D (ISO 8), que corresponden a: laboratorios de Control de Calidad donde se llevan a cabo distintos *test* de control para insumos, materias primas, fluido viral y vacuna producto terminado entre otros; Bioterio de cría de animales libres de patógenos específicos (spf); laboratorios de Cultivos Celulares Normales, proveedor de cultivos de distintas líneas celulares para diagnóstico, ensayos de control de calidad y productor del sustrato de la Vacuna Candid # 1, la línea celular FRhL-2 (células de pulmón de feto de mono *Rhesus*).

En cuanto a la cantidad de partículas viables, las normas vigentes solo recomiendan ciertos límites para las áreas clasificadas. Por tal motivo, determinar los valores internos de alerta y de acción donde las normas no establecen límites de referencia, es útil para todas las áreas clasificadas y no sólo para aquellas donde se elabora un producto estéril.⁸ Esta información es de utilidad para verificar el estado de control del área y prever una tendencia de desvío de las condiciones habituales, permite iniciar una investigación con implementación de acciones correctivas inmediatas en caso de ser necesario.

El control ambiental en la Unidad de Producción del INEVH se ejerce mediante barreras sanitarias a distintos niveles. El ingreso de personal, de materiales y de equipos se hace a través de puertas exclusas. Se utiliza vestimenta adecuada para las actividades a desarrollar dentro de cada área, éstas actúan como una barrera entre la flora microbiana de la piel del operador y el ambiente. Existen procedimientos escritos donde se detallan los programas de limpieza y desinfección, especificando frecuencia y rotación de desinfectantes.⁹ El aire que ingresa a través de filtros *HEPA* de eficiencia comprobada, es acondicionado para mantener una temperatura y humedad constantes. Las presiones diferenciales entre ambientes para direccionar el flujo de aire es otro de los mecanismos utilizados para proteger al producto, en algunos casos, o al medio ambiente en otros. Todos estos mecanismos, puestos en funcionamiento conjuntamente, intentan mantener al ambiente bajo un estado de control para garantizar entre otras cosas la calidad microbiológica.

El estado de control de estas áreas es rutinariamente verificado a través de programas de monitoreo ambiental para partículas viables y no viables como así también a través de parámetros físicos como temperatura, humedad relativa y presiones diferenciales. La instauración de un plan de monitoreo microbiológico ambiental requiere evaluaciones de la calidad microbiológica del aire presente en el interior de los ambientes, indumentaria de los operadores y superficies.¹⁰⁻¹²

Este trabajo pretende establecer los límites microbiológicos internos de alerta y de acción para el monitoreo ambiental y de operadores y detectar las condiciones de riesgo para las áreas clasificadas como Grado D en la planta de producción del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas INEVH y de esta forma contribuir a que en dichas áreas para la producción y el control de los productos intermedios y finales se garantice la calidad y se mantenga bajo control.

MÉTODOS

MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE LAS ÁREAS CLASIFICADAS

Se realizó el monitoreo de la calidad microbiológica de la vestimenta y los ambientes de áreas Grado D destinadas a distintas operaciones involucradas en la producción y el control de vacunas para obtener los recuentos bacterianos a fin de utilizarlos para establecer los límites internos de alerta y acción. La toma de muestras para la evaluación se realizó en un período que abarcó desde marzo a noviembre del año siguiente, según la metodología recomendada por la Farmacopea Argentina.¹³

ÁREAS SELECCIONADAS PARA LA EVALUACIÓN

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

- Laboratorios de Producción de Cultivos Celulares Normales
- Laboratorios de Control de Calidad
- Bioterio de Cría de Animales SPF (*specific patogen free*)

MONITOREO DE SUPERFICIES Y VESTIMENTA

La toma de muestra en las superficies y la 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. En ambos tipos de placas se utilizó medio de cultivo microbiológico *Agar D/E Neutralizing* (*BD-Difco*), preparadas según instrucciones del fabricante. Las placas tuvieron un plazo de validez de 20 días conservadas entre 2 °C a 8 °C.^{14,15}

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 cultivos celulares normales, ejecución de ensayo de esterilidad, cría y cuidado de ratones SPF.^{16,17}

MONITOREO DEL AIRE

Las muestras de aire fueron tomadas, en todas las áreas, mediante el método activo en reposo y en proceso.¹⁸⁻²⁰

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 1 000 litros.

En el equipo colector se utilizaron placas de *Petri* de 90 mm de diámetro con *Agar Tripticosa Soja* (*BD-Difco*). Todos los medios de cultivos microbiológicos contaron con certificado de análisis. Los mismos fueron preparados siguiendo 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.^{21,22} Los recuentos fueron registrados en UFC (unidades formadoras de colonias).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE ALERTA Y ACCIÓN

De acuerdo a la naturaleza y la forma en que se comportan los microorganismos, la distribución de los resultados obtenidos por métodos microbiológicos se puede describir mediante la Distribución de *Poisson*.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en UFC, de los monitoreos correspondientes a cada ambiente de las áreas clasificadas Grado D, se realizó mediante el cálculo de la media aritmética y la desviación estándar.²³

Se calculó la franja habitual de trabajo y los límites internos para cada área clasificada de la siguiente forma:

- *Intervalo Habitual de Trabajo*: desde cero hasta la media aritmética aumentada en dos desviaciones estándar.
- *Límite de Alerta*: media aritmética aumentada en un desviación estándar.
- *Límite de Acción*: para valores por encima del valor más alto obtenido para el Intervalo Habitual de Trabajo.

RESULTADOS

LÍMITES DE ALERTA Y ACCIÓN

El estudio sistemático del ambiente de estas áreas limpias y el posterior análisis estadístico de los recuentos obtenidos, proveyó datos para establecer el intervalo de recuentos habituales de trabajo y determinar los límites internos de alerta y de acción (tablas 1, 2, 3). Se calcularon los intervalos habituales de trabajo y límites de alerta para antes y después de la limpieza de superficies de áreas de uso común, por ejemplo pasillos y oficinas, boxes de uso restringido a determinadas actividades que requieren mayor limpieza en el ambiente y para el área total de la instalación, pasillo y boxes. Se calcularon además para la indumentaria segregando, ropa, guantes durante la vestimenta y guantes pos trabajo. Se calculó también para el aire de los boxes en estado de reposo y de proceso. El límite de acción corresponde a los valores que sobrepasan al intervalo habitual de trabajo.

En base a los resultados obtenidos se proponen los límites de alerta y acción de aplicación a todas las áreas Grado D del INEVH (tabla 4) fundamentales para detectar cambios en la tendencia o desvíos con la suficiente antelación para comenzar los estudios pertinentes y aplicar medidas correctivas inmediatas.^{8,23}

Tabla 1. Límites de Alerta y Acción. Bioterio

	Superficies (UFC/placa)					
	Pre Limpieza			Pos Limpieza		
	Área Uso Común	Boxes	Área Total	Área Uso Común	Boxes	Área Total
	n=39	n=72	n=111	n=38	n=72	n=110
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-6	0-21	0-16	<3	0-4	≤3
Límite Alerta (UFC)	5	17	13	-	3	-
	Indumentaria (UFC/placa)					
	Ropa Estéril	Guantes (5 dedos)		Guantes (5 dedos)		
	Pre Trabajo	Pre Trabajo		Pos Trabajo		
	n=30	n=12		n=10		
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-10	≤3		0-5		
Límite Alerta (UFC)	7	-		3		
	Aire (UFC/m ³)					
	Aire Box-Mét. Act.					
	Reposo			Proceso		
	n=4			n=4		
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-34			0-100		
Límite Alerta (UFC)	30			90		

Tabla 2. Límites de Alerta y Acción. Cultivos Celulares Normales

	Superficies (UFC/placa)					
	Pre Limpieza			Pos Limpieza		
	Área Uso Común	Boxes	Área Total	Área Uso Común	Boxes	Área Total
	n=101	n=126	n=227	n=100	n=126	n=226
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-53	0-23	0-37	0-4	0-4	0-4
Límite Alerta (UFC)	47	19	32	3	3	3
	Indumentaria (UFC/placa)					
	Ropa Estéril		Guantes (5 dedos)	Guantes (5 dedos)		
	Pre Trabajo		Pre Trabajo	Pos Trabajo		
	n=111		n=50	n=42		
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-5		<3	0-11		
Límite Alerta (UFC)	3		-	8		
	Aire (UFC/m ³)					
	Aire Box-Mét. Act.					
	Reposo		Proceso			
	n=4		n=4			
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-8		0-71			
Límite Alerta (UFC)	6		64			

Tabla 3. Límites de Alerta y Acción. Control de Calidad

	Superficies (UFC/placa)					
	Pre Limpieza			Pos Limpieza		
	Área Uso Común	Boxes	Área Total	Área Uso Común	Boxes	Área Total
	n=44	n=80	n=124	n=44	n=80	n=124
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-58	0-40	0-47	0-5	0-5	0-5
Límite Alerta (UFC)	52	35	41	3	3	
	Indumentaria (UFC/placa)					
	Ropa Estéril		Guantes (5 dedos)		Guantes (5 dedos)	
	Pre Trabajo		Pre Trabajo		Pos Trabajo	
	n=95		n=38		n=30	
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-7		<3		<3	
Límite Alerta (UFC)	5		-		-	
	Aire (UFC/m ³)					
	Aire Box-Mét. Act.					
	Reposo			Proceso		
	n=8			n=7		
Intervalo Habitual y Límite de Acción (UFC)	0-164			0-195		
Límite Alerta (UFC)	152			182		

Tabla 4. Límites de Alerta y Acción propuestos para Áreas Grado D del INEVH

	Superficies (UFC/placa)		
Límite de Acción (UFC)	Pre Limpieza		Pos Limpieza
	50		5
Límite Alerta (UFC)	40		3
	Indumentaria (UFC/placa)		
Límite de Acción (UFC)	Ropa Estéril Pre Trabajo	Guantes (5 dedos) Pre Trabajo	Guantes (5 dedos) Pos Trabajo
	10	3	5
Límite Alerta (UFC)	7	-	-
	Aire (UFC/m ³)		
	Aire Box- Mét. Act.		
Límite de Acción (UFC)	50		200
Límite Alerta (UFC)	30		150

DISCUSIÓN

Es fundamental para estas áreas limpias donde se manufacturan o ensayan productos biológicos estériles, mantener los ambientes bajo control de manera que se reduzca drásticamente la introducción, generación y retención de contaminantes, entendiéndose por contaminación a "la introducción no deseada de impurezas de naturaleza química o microbiológica, o de sustancias extrañas, dentro o sobre las materias primas o productos intermedios, durante la producción, muestreo, acondicionamiento, almacenamiento o distribución".²⁴

La autoridad regulatoria argentina ANMAT, recomienda ciertos límites microbiológicos;⁵ para un área clasificada como Grado D en proceso, la norma recomienda: 200 UFC/m³ en muestras de aire, 100 UFC/placa de 90 mm con hasta 4 horas de exposición, 50 UFC/placa de contacto de 55 mm y no define límite para la impresión de los dedos enguantados.

Los recuentos obtenidos de las superficies de las áreas clasificadas, provienen de los monitoreos realizados antes y después de la limpieza hechos para evaluar la efectividad del programa de limpieza y desinfección aplicado a todos los laboratorios de la Unidad de Producción del INEVH. Los datos provistos por estos recuentos muestran el peor y mejor caso en cuanto a la contaminación microbiológica del área, ya que los recuentos pre limpieza indican el estado microbiológico posproceso y el poslimpieza las condiciones previas al proceso, dejando al estado "en proceso" considerado por la norma como una situación intermedia. Este programa y su correspondiente control adquieren su mayor relevancia en el mantenimiento de las áreas limpias bajo control microbiológico permitiendo asegurar y sostener la clasificación de área.

Los recuentos obtenidos antes y después de la limpieza de los ambientes del Bioterio muestran valores máximos que no superan las 50 UFC/placa, límite sugerido por la norma para ambientes Grado D (ISO 8). Los bajos recuentos encontrados fueron valores esperados, debido a que solo ingresan al sector dos personas entrenadas para tal fin y con vestimenta estéril que cubre al cuerpo completamente. Los valores de los recuentos descienden considerablemente después de la limpieza.

El número de muestras de aire no sería estadísticamente suficiente, aunque muestra una tendencia a tener recuentos por debajo de las 200 UFC/m³ en proceso, valor recomendado por la norma para ambientes Grado D (ISO 8).

Por otra parte, si bien no hay recomendaciones para la indumentaria de personas que ingresan a áreas Grado D, los resultados se muestran compatibles con un área Grado B (ISO 5).

La reglamentación aplicada desde 1996 para Bioterios de laboratorios elaboradores de especialidades medicinales y/o análisis para terceros en el marco de las Buenas Prácticas de Laboratorios, no hace referencia a un Grado de pureza de aire determinado para las actividades que ahí se desarrollan.²⁵ El sostenimiento de la calidad de animales libres de patógenos específicos en el INEVH desde varios años atrás, permite sugerir que esta clase de área Grado D (ISO 8) sería apropiada para la cría de animales de la calidad descripta.

En los Laboratorios de Cultivos Celulares Normales, se muestran valores por encima de las 50 UFC/placa en superficies prelimpieza de áreas de uso común. A diferencia del Bioterio, aquí el personal es más numeroso y se encuentra realizando las actividades de rutina, para lo cual utilizan vestimenta no estéril y que no cubren la totalidad del cuerpo. Estos valores descienden drásticamente después de la limpieza.

Las muestras de aire tomadas en los Laboratorios de Cultivos Celulares Normales fueron escasas, aunque muestran una tendencia de los valores en UFC a estar por debajo de los límites recomendados para el estado en proceso (200 UFC/m³).

Se obtuvieron los límites internos para los recuentos microbiológicos sobre la indumentaria utilizada para procedimientos asépticos realizados en este sector. De forma similar al Bioterio, los recuentos en la vestimenta se muestran compatibles con los límites recomendados por la norma para personas que ingresan a un área Grado B (ISO 5).

Los Laboratorios de Control de Calidad, al igual que los anteriormente considerados, son Grado D (ISO 8), pero presentan características diferentes para el direccionamiento del aire. Esto se debe, a que las presiones diferenciales, hacen que el aire ingrese desde el pasillo de circulación a los boxes. De esta forma, los boxes funcionan como ambientes de Nivel III de biocontención, brindan protección al exterior de microorganismos infecciosos o potencialmente infecciosos.

El intervalo habitual en superficies prelimpieza, presenta valores elevados, por encima de las 50 UFC/placa, que disminuyen ampliamente después de la limpieza. También en este caso, debe considerarse la circulación del personal, con vestimenta no estéril y que no cubre a la totalidad del cuerpo.

Los muestreos de indumentaria en Control de Calidad se realizan durante la ejecución del ensayo de esterilidad. Este procedimiento aséptico, de corta duración, se lleva a cabo dentro de un Gabinete de Seguridad Biológica (GSB). Los resultados

para la indumentaria estéril, no solo se muestran compatibles con los límites para personas que ingresan a un área Grado B (ISO 5), sino que los recuentos en dedos de manos enguantadas postrabajo, también se encuentran dentro de lo recomendado por la norma para esa clasificación.

Aunque el número de muestras de aire tomadas por el método activo es pequeño para concluir, presenta una tendencia a valores de recuentos cercanos a las 200 UFC/m³ sugeridas, tanto en estado de reposo como en proceso. La presión negativa del Laboratorio con respecto al exterior podría acarrear gran cantidad de partículas transportadoras de microorganismos, sin embargo, los recuentos obtenidos muestran la eficacia tanto de los desinfectantes utilizados como así también de las técnicas de limpieza y las demás barreras sanitarias utilizadas para mantener el área bajo control microbiológico. Lo expresado anteriormente permite justificar el uso de las 200 UFC/m³ como límite interno solo para las áreas Grado D de Control de Calidad, tanto en condiciones de reposo como de proceso.

Del análisis de los resultados obtenidos de las distintas áreas Grado D que componen la planta de producción del INEVH, surgen los límites de alerta y acción propuestos (tabla 4) para ser utilizados de manera general como una herramienta tendiente a colaborar con el sostenimiento del control microbiológico de todas sus áreas.

El análisis de los resultados de los controles microbiológicos realizados en los ambientes de las áreas clasificadas Grado D de la Unidad de Producción, a través de las muestras tomadas en superficies, vestimentas y aire, permitió calcular los intervalos habituales de trabajo. Dentro de los mismos, deberían encontrarse los valores de recuentos que se obtienen de rutina en estas áreas clasificadas. En relación a estos intervalos, el establecimiento de los valores para los límites internos de alerta y acción, permite actuar con mayor rapidez, ante cualquier desvío de las condiciones habituales, para aplicar las medidas correctivas necesarias.²⁶

La amplia disminución de los recuentos en superficies después de la limpieza demostró que los programas de limpieza y desinfección aplicados por los operarios han sido efectivos para mantener una biocarga aceptable en todas las instalaciones. Con un programa de monitoreo ambiental establecido, los límites de alerta y acción deben ser re evaluados periódicamente. Está demostrado ampliamente en la bibliografía los individuos son la principal fuente de diseminación de partículas transportadoras de microorganismos.²⁷ 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 tiene que ser bajo. Por la misma razón, es muy importante mantener los entrenamientos de colocación de indumentaria estéril y su calificación.

El trabajo realizado brinda las herramientas necesarias para proporcionar una guía a todos los laboratorios que integran la Unidad de Producción del INEVH, tendiente a colaborar con la mejora continua en el sostenimiento de las áreas bajo estricto control microbiológico. La actitud proactiva para alcanzar los requerimientos y recomendaciones de las normas nacionales e internacionales, lleva en consecuencia a un mejoramiento del programa de aseguramiento de la calidad de los productos elaborados.

Agradecimientos

Los autores del trabajo desean expresar el agradecimiento:

A los Técnicos del Laboratorio de Control de Calidad del INEVH, Sra. Carina Paz, Sr. Alejandro Raggio, Sra. Florencia Cantore, Srta. Gisele Lázzari y Sr. Nahuel Martínez por su colaboración indispensable para el desarrollo de las prácticas microbiológicas del presente trabajo con responsabilidad y dedicación.

Al personal de los Laboratorios de Cultivos Celulares Normales y Bioterio del INEVH por su colaboración en las tomas de muestras.

A las autoridades de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud - ANLIS (Argentina) y del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" - INEVH por haber gestionado y provisto el financiamiento requerido para las actividades de producción y control de Vacuna Candid # 1, proyecto en el cual impactan los resultados del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sutton S. The Importance of Microbiology in the Contamination Control Plan for Aseptic, Terminally Sterilized and Non-sterile Manufacturing. *Pharm Microbiol Forum (PMF) Newsletter*. 2007;13(6):3-11.
2. World Health Organization - Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities. 3rd Draft. Geneva: WHO; 22 Mar 2010.
3. Agalloco J. Importance of Background Microbial Levels in the Manufacture and Testing of Sterile Products. *Pharm Technol*. April 2005. Disponible en: http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/5b473a71-17b9-4c3d-a0c0-284f9ccb0076/article-155377.pdf
4. The International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated controlled environments. Part 1: Classification of air cleanliness. International Standard. ISO 14644-1:1999(E). Geneva: ISO; 1999.
5. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de Salud. Argentina. Disposición N° 2819/04. 2004 y modificaciones - Disposición N° 4844/2005. Buenos Aires: ANMATM; 2004.
6. Ambrosio AM, Saavedra MC, Riera LM, Fassio RM. La Producción Nacional de Vacuna a Virus Junin Vivo Atenuado (Candid #1) Anti-Fiebre Hemorrágica Argentina. *Acta Bioquím Clín Latinoamer*. 2006;40(1):5-17.
7. Enria DA, Barrera Oro JG. Junin Virus Vaccines. En: Arenaviruses II. The molecular pathogenesis of arenavirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;263:239-264.
8. Clontz L. Environmental Monitoring. *Pharm Microbiol Forum (PMF) Newsletter*. 2004;11(1):2-4.

9. Salaman-Byron AL. Bioburden Method Suitability for Cleaning and Sanitation Monitoring: How Far Do We Have to Go? *Pharm Technol.* 2010; 34(8). Disponible en: <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Analytics/Bioburden-Method-Suitability-for-Cleaning-and-Sani/ArticleStandard/Article/detail/683682>
10. Sutton S. Qualification of an Environmental Monitoring Program - 1. Selection/Justification of Sample Sites. *Pharm Microbiol Forum (PMF) Newsletter.* 2008; 14(8): 2-8.
11. United States Pharmacopeia. Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments. Compendios de Normas Oficiales. Ed. N° 38, <1116>. Rockville, MD: USPC, Inc.; 2015.
12. Whyte & Eaton. Risk Management of Contamination (RMC) During Manufacturing Operations in Cleanrooms. A joint Publication of the Parenteral Society and the Scottish Society for Contamination Control. Technical Monograph N° 14; 2005. ISBN N° 1-905271-12-3.
13. Whyte W. Collection efficiency of microbial methods used to monitor cleanrooms. *Euro J Parenteral & Pharm Sci.* 2005; 10(2):5.
14. Sutton S. Surface Sampling Methods for Bioburden. *Pharm Microbiol Forum (PMF) Newsletter.* 2008; 14(6): 9-12.
15. The International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control Part 1: General principles and methods. International Standard 1st Ed. ISO 14698-1:2003(E). Geneva: ISO; 2003.
16. Ljungqvist & Reinmüller Predicted Contamination Levels in Cleanrooms When Cleanroom-Dressed People Are the Contamination Source . *Pharm Technol.* 2006. Disponible en: <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Aseptic+processing/Predicted-Contamination-Levels-in-CleanroomsWhenCI/ArticleStandard/Article/detail/322983>
17. Ljungqvist & Reinmüller Aseptic Production, Gowning Systems and Airborne Contaminants. *Pharm Techno* (suppl). 2005. Disponible en: <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/data/articlestandard//pharmtech/202005/160408/article.pdf>
18. Whyte W, Green G, Albisu A. Collection efficiency and design of microbial air samplers. *Aer Sci.* 2007; 38(1): 97-110.
19. Ljungqvist & Reinmüller. Active Sampling of Airborne Viable Particles in Controlled Environments: a comparative study of common instruments *Euro J Parenteral & Pharm Sci.* 1998; 3(3): 59-62.
20. Stewart SL, Grinshpun SA, Willeke K, Terzieva S, Ulevicius V, Donnelly J. Effect of Impact Stress on Microbial Recovery on an Agar Surface. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(4): 1232-1239.
21. Sutton S. Counting Colonies. *Pharm Microbiol Forum (PMF) Newsletter.* 2006; 12(9): 2-6.

22. United States Pharmacopeia. Optimas prácticas de laboratorio microbiológico. Compendios de Normas Oficiales. ISBN 1-889788-71-5. Ed. N°33, <1117>. Rockville, MD: USPC, Inc.; 2010. p.672-676.
23. 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.
24. World Health Organization. Technical Report Series N° 908. Geneve: WHO; 2003.
25. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de Salud. Argentina. Disposición N° 6344/96. Buenos Aires: ANMATM; 1996.
26. 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). Geneva: ISO; 2004.
27. Whyte & Hejab. Particle and microbial airborne dispersion from people. *Euro J Parenteral & Pharm Sci.* 2007; 12(2):8.

Recibido: 13 de julio de 2015

Aprobado: 18 de septiembre de 2015

Alejandro Javier Bottale. Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" INEVH - ANLIS Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA). Alberti 242, 2700 Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Teléfono: 54-2477-15492278. Correo electrónico: abottale@anlis.gov.ar