

Determinación del tiempo equivalente acumulado durante los ciclos de esterilización, por vapor saturado, en un fermentador empleado en la producción de vacunas

Jorge A. Padrón¹, Jorge Fernández¹, José Suárez¹, Lissette L. Pucheta¹, Gerardo Limia¹, Laritza Carballosa¹, Camilo Gandolff¹, Orlando Martínez¹, Alberto Gómez², Javier Carcache².

¹ Grupo Nacional de Validación. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: Jorgepp@finlay.edu.cu

² Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

Se realizó una revisión acerca de la esterilidad y de los procesos de esterilización en equipos empleados a escala de producción. Se describe el concepto de F_0 y su empleo en la evaluación de la efectividad de un proceso de esterilización. Se estudió el perfil de temperatura en diferentes secciones del fermentador durante los ciclos de esterilización, encontrándose algunas secciones en las cuales el tiempo equivalente no era suficiente por lo que se propusieron modificaciones, que luego de ejecutadas permitieron obtener resultados satisfactorios.

Palabras claves: Esterilización, validación, fermentadores, reactores

Introducción

La esterilización constituye uno de los procesos más críticos, en la producción de medicamentos, sin embargo, no todos los materiales, productos o equipos se esterilizan de igual forma.

Los equipos de grandes dimensiones que se emplean en los procesos de producción, como fermentadores, reactores y tanques instrumentados se esterilizan en el mismo lugar donde están instalados (*in situ*), usando como medio esterilizante vapor saturado, en la mayoría de los casos (2, 7, 15).

El proceso es controlado por un sistema automatizado que asegura que, además del vaso, todos los dispositivos y accesorios (válvulas, sistemas de filtros, puertos de accesos para sondas de temperatura, pH, u otras) sean expuestos durante el tiempo requerido al vapor saturado, siguiendo una secuencia programada; los ciclos de este tipo se denominan SIP (*Steam In-Place*) (1, 2). Existen también equipos industriales cuyo nivel de automatización no es elevado y sólo se controlan algunas etapas, siendo necesaria la operación semiautomática o incluso manual del proceso de esterilización, en algunas partes o secciones.

La definición de esterilidad más simple, y correctamente establecida, es la completa ausencia de toda forma de vida. En el campo de las producciones farmacéuticas, este concepto se refiere especialmente a los microorganismos (4).

En términos prácticos, la esterilidad se expresa como la probabilidad matemática de que una unidad de producto permanezca contaminada con microorganismos sobrevivientes, después de una exposición a un proceso de esterilización.

Para productos farmacéuticos y dispositivos médicos la designación de estériles es generalmente aplicada a productos que han sido tratados de manera tal, que una vez completado el proceso, las unidades individuales tengan una probabilidad de ser no-estériles igual o menor que 10^{-6} ; a esta probabilidad también se le denomina nivel de aseguramiento de la esterilidad o SAL (*Sterility Assurance Level*) (4).

Aunque la definición de esterilidad se expresa como una función de probabilidad, esto no significa, sin embargo, que una unidad no estéril en 10^{-6} sea aceptada (3, 4, 6).

La letalidad de un proceso de esterilización por calor húmedo es una función de la temperatura del vapor saturado (8), y del tiempo de exposición, por lo que diferentes combinaciones de temperatura y tiempo pueden lograr un resultado eficaz. Otros factores que también influyen son la naturaleza de los materiales a esterilizar, su estado de agregación y su sensibilidad al calor.

La naturaleza de muchas soluciones, tales como medios de cultivos y suplementos, que poseen en su composición compuestos de origen orgánicos, hacen que estas sean sensibles a los efectos del calor por lo que no siempre pueden ser esterilizadas en las condiciones deseadas.

En la literatura especializada (3, 9, 10) se acepta generalmente, que una exposición a 121 °C, durante 15 min debe eliminar toda forma de vida microbiana, aunque otras combinaciones que logren el efecto deseado también son admitidas.

Debido a esto es que se precisa de una magnitud que permita comparar entre sí, la letalidad producida bajo diferentes combinaciones de temperatura-tiempo.

El cálculo de la letalidad se realiza a partir de un término denominado *tiempo equivalente*, que se representa como F. El valor F es un parámetro que permite juzgar la efectividad del proceso de esterilización.

Si en el estudio de un ciclo calculamos el valor F en varios puntos y en el punto de menor valor de F este tiempo es suficiente, para alcanzar el nivel de esterilización deseado, entonces podemos asegurar que el ciclo de esterilización proporciona el calor necesario a toda la carga (3).

En este trabajo se estudia el proceso de esterilización que se realiza en un fermentador típico, destinado a la obtención de cultivos a escala de producción.

Materiales y Métodos

Matemáticamente, podemos definir al tiempo equivalente (F) como la integral de la letalidad (L) con respecto al tiempo, lo cual significa que en un gráfico de temperatura vs. tiempo, el valor F puede calcularse como el área bajo la curva:

$$F = \int_{t_1}^{t_2} L dt$$

La solución de esta integral nos conduce a un modelo en el cual el valor F es calculado como la sumatoria de la letalidad, durante un intervalo de tiempo dado (6, 12). La nueva expresión obtenida se formula de la siguiente forma:

$$F = \Delta t \sum 10^{\frac{(T-T_b)}{Z}}$$

En el caso particular de la esterilización por vapor saturado, el parámetro F se identifica como Fo, la temperatura base (Tb) es igual a 121,1 °C y el parámetro Z es igual a 10 °C, T representa la temperatura real en un instante cualquiera y Δt el tiempo.

Se estudió como modelo un fermentador Chemap de 75 L. Su sistema de control automático le permite, durante el proceso de esterilización, controlar la temperatura del vaso, pero no la duración del ciclo, que debe ser controlada por el operador. El resto de las secciones debe ser esterilizado en forma manual.

El estudio se realizó por secciones; éstas aparecen descritas a continuación.

1. Sistema de filtros de entrada y salida
2. Sistema de líneas externas
3. Sistema de sello mecánico
4. Sistema de tomamuestras
5. Línea de cosecha
6. Vaso del fermentador

En cada sección se realizaron tres corridas experimentales consecutivas, durante las cuales se registraron las temperaturas y se calcularon automáticamente los valores del Fo acumulado. El criterio de aceptación fue que el proceso de esterilización entregara un Fo ≥ 15 min.

Antes de cada estudio se calibró el sistema de medición, para asegurar que las mediciones de temperatura tuvieran un error inferior a 0,5 °C (6, 11).

Para la medición y registro de los perfiles de temperatura se empleó un sistema de adquisición de datos formado por un conjunto de equipos y accesorios que se encuentran conectados entre sí.

Este sistema está constituido por:

1. Computadora industrial, en la cual se almacenan todos los datos obtenidos y se efectúan los cálculos.
2. Programa "Prometeo" (ver. 2,04) desarrollado en Lab Windows 3,0, para el procesamiento automatizado en tiempo real.
3. Tarjeta de adquisición de datos AT-MIO-16X para la lectura de datos desde el sistema acondicionador de señales.
4. Sistema SCXI-1120, al cual se conectan los termopares y la tarjeta de adquisición de datos.
5. Calibrador de temperatura, con un rango de 50-600 °C ± 0,5 °C, empleado en la calibración de los termopares.

6. Termómetro digital y resistencia de platino (100 Ω a 0 $^{\circ}\text{C}$) empleado en la calibración de los termopares.
7. Juego de 12 termopares tipo T para medir la temperatura dentro del vaso del fermentador.
8. Juego de 20 termopares tipo T, para medir la temperatura en las vías externas del fermentador.
9. Fuente de alimentación ininterrumpida, para la alimentación independiente de todo el sistema de medición.

Los sistemas formados por el filtro de entrada y el filtro de salida, el sello mecánico, el tomamuestras y la vía de cosecha se esterilizan de forma independiente con respecto a cualquier otra operación en el fermentador. Estos sistemas se alimentan con vapor saturado directamente de la línea, por lo cual la temperatura que alcanzan depende exclusivamente de la presión del vapor. El control del tiempo de esterilización se realiza de forma manual. Las líneas externas se esterilizan conjuntamente con el vaso, en una misma operación.

La esterilización del vaso es ejecutada de forma semiautomática: la temperatura del proceso (121,1 $^{\circ}\text{C}$) es controlada automáticamente, mientras que el tiempo (20 min) se controla manualmente.

Además del perfil de temperatura, en el vaso del fermentador se realizó un desafío microbiológico (10, 16). Se emplearon 12 ampollitas con esporas de *Bacillus stearothermophilus*, ATCC 7953, con una concentración reto de $1,2 \times 10^6$ UFC y un valor $Z=10$ $^{\circ}\text{C}$.

En cada corrida se colocaron 4 ampollitas, a dos niveles, y se retiraron una vez concluido el ciclo de esterilización. Luego de realizados todos los ciclos estas fueron incubadas en las condiciones descritas por el fabricante (55 $^{\circ}\text{C}$, durante 7 días).

Los resultados obtenidos se muestran organizados en tablas, mostrándose en cada uno de los casos:

- La identificación del sistema estudiado
- Los parámetros del ciclo de esterilización
- Identificación de los termopares usados
- Identificación de las corridas
- Valores de F_o alcanzados

Resultados y Discusión

La primera sección estudiada fue el sistema de filtros. Este sistema está formado por el filtro de entrada, que permite suministrar aire al proceso y el filtro de salida de gases.

Sus resultados son expuestos en la Tabla 1.

Tabla 1. Sistema de filtros de entrada y salida (20 min a 121 $^{\circ}\text{C}$)

Termopar No.	C1 F_o (min)	C2 F_o (min)	C3 F_o (min)
T3	35,6	51,8	111,5
T4	19,2	25,2	47,7
T5	36,2	72,8	178,3
T6	19,0	14,8	33,2
T7	30,9	54,9	62,8
T8	23,5	44,2	62,7

Los valores de F_o alcanzados son mayores de 15 min, excepto en el caso del termopar T6, durante la corrida 2; esto se debió a un ineficiente contacto térmico entre la pared de la tubería y el termopar por lo que se consideró válida la corrida. Los termopares próximos a T6 (T7 y T8) no mostraron dificultades y sus valores de F_o superaron el valor de 15 min.

Un análisis de la dispersión mostrada, en los valores de F_o , indica que esta se debe principalmente a las variaciones en la presión del vapor y en menor grado al control manual del tiempo de la operación.

Posteriormente se estudió el sistema de líneas externas, el cual alcanzó en las primeras corridas valores insuficientes de letalidad, por lo que se decidió aumentar el tiempo de duración del ciclo hasta 25 min, ya que no era posible aumentar la temperatura. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Sistema de líneas externas (25 min a 121 $^{\circ}\text{C}$)

Termopar No.	C1 F_o (min)	C2 F_o (min)	C3 F_o (min)
T1	18,3	18,3	17,8
T2	22,6	21,8	22,0
T3	23,4	25,4	25,8
T4	19,1	19,2	18,9

En la Tabla mostrada se observa que los valores de F_o alcanzados superan el criterio de aceptación (15 min a 121,1 $^{\circ}\text{C}$).

Al estudiar los perfiles de temperatura en el sistema de sello mecánico, se encontró que la válvula reductora de presión, que alimenta este sistema, mostraba variaciones en la presión de salida. Una variación de sólo 0,15 bar, tratándose de vapor saturado, provoca una diferencia de

temperatura de hasta 2,4 °C (8); debido a esto se sustituyó la válvula reductora de presión. Una vez realizada esta operación se realizó el estudio, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 3.

Los elevados valores de Fo alcanzados por T6, en las tres corridas se deben solamente a que este se encontraba situado a la entrada del circuito de suministro de vapor, donde la temperatura promedio osciló alrededor de 135 °C, lo cual representa un valor acumulado de 25,1 min de Fo, por cada min de tiempo real. El resto de los puntos estudiados no presentaron problema alguno, siendo superiores a 15 min, los valores de Fo obtenidos.

Tabla 3. Sistema de sello mecánico (20 min a 121 °C)

Termopar No.	C1 Fo (min)	C2 Fo (min)	C3 Fo (min)
T6	572,6	481,6	468,9
T7	32,5	23,6	30,5
T8	55,9	39,6	50,9

A continuación se estudió el sistema de tomamuestra, durante el cual se encontraron inicialmente, bajos valores de Fo. La salida del vapor se realizaba a una conexión que no incluía una trampa de vapor por lo que la temperatura oscilaba entre 116 y 119 °C, lo cual requería más tiempo de exposición para lograr el valor deseado de Fo. Una vez colocada una conexión a una trampa de vapor, adecuada al flujo que circulaba, se ejecutó nuevamente el estudio, mostrándose en la Tabla 4 los datos obtenidos.

Tabla 4. Sistema de tomamuestra (15 min a 121 °C)

Termopar No.	C1 Fo (min)	C2 Fo (min)	C3 Fo (min)
T11	32,8	26,1	21,7
T12	20,0	17,4	19,4

Ningún valor de Fo reportado, es inferior a 15 min considerándose apropiada la modificación realizada.

La siguiente sección o sistema estudiado fue el formado por la línea de cosecha. Este sistema no presentó problema alguno durante las tres corridas efectuadas; los valores de Fo que se alcanzaron fueron superiores al límite establecido por el criterio de aceptación.

Tabla 5. Sistema de línea de cosecha (15 min a 121 °C)

Termopar No.	C1 Fo (min)	C2 Fo (min)	C3 Fo (min)
T7	59,8	121,7	185,0
T8	52,0	84,7	88,0

Todos los valores de Fo alcanzados, fueron superiores a 15 min.

En las secciones anteriores la no existencia de un sistema de control automático conduce a que exista dispersión en algunos valores de Fo alcanzados, aunque estos son superiores a los 15 min (14, 15).

Por último, se investigó el proceso de esterilización que se efectúa en el interior del vaso del fermentador.

Para este estudio se requirió de un dispositivo que permitiera penetrar en el vaso del fermentador y mantener a su vez, la hermeticidad. En este caso en particular se utilizó el puerto correspondiente al sensor de pH, por no tener influencia en el lazo de control del proceso de esterilización.

En la Tabla 6 se exponen los resultados obtenidos durante las corridas. Los 12 termopares mostraron haber alcanzado valores de Fo mayores que 15 min, por lo cual el proceso es satisfactorio.

Tabla 6. Vaso del fermentador (20 min a 121 °C)

Termopar No.	C1 Fo (min)	C2 Fo (min)	C3 Fo (min)
T1	29,0	30,9	29,2
T2	28,3	29,9	28,4
T3	27,1	28,5	27,0
T4	28,4	30,0	28,3
T5	26,3	27,4	26,0
T6	27,3	28,6	27,0
T7	27,4	28,6	27,0
T8	26,6	27,7	26,1
T9	26,2	29,1	26,5
T10	27,0	29,5	27,7
T11	26,1	27,4	25,4
T12	28,6	29,8	28,9

En este caso en particular, se observa una distribución muy uniforme del calor debido al efecto del lazo de control automático.

La Tabla 7 muestra el análisis estadístico de los resultados del estudio de esta sección. En la misma se

observa el comportamiento muy similar de los ciclos; la desviación absoluta promedio, durante las tres corridas alcanzó un valor máximo de 1,01 min.

Tabla 7. Resumen Estadístico (Vaso del fermentador)

Parámetro analizado	C1	C2	C3
	Fo (min)	Fo (min)	Fo (min)
Valor de Fo máximo	29,0	30,9	29,2
Valor de Fo promedio	27,4	29,0	27,3
Valor de Fo mínimo	26,1	27,4	25,4
Coefficiente de variación	0,037	0,039	0,044

Los bioindicadores sometidos al proceso de esterilización, incluyendo los usados como controles positivos fueron incubados durante un periodo de siete días, a una temperatura de 55 °C.

El resultado del reto con bioindicadores es mostrado en la Tabla 8.

Tabla 8. Reto microbiológico con esporas de *B. stearothermophilus*

Termopar No.	C1	C2	C3
T1	-	-	-
T2	-	-	-
T7	-	-	-
T8	-	-	-
Controles positivos (CP)			
CP1	+	+	+
CP2	+	+	+

Leyenda: - no mostraron crecimiento
+ mostraron crecimiento

Todos los indicadores biológicos que fueron expuestos al calor no mostraron evidencia de crecimiento microbiano, por lo que puede asegurarse que el proceso de esterilización produjo una letalidad adecuada para la eliminación de las esporas; los indicadores biológicos usados como controles positivos manifestaron un cambio de coloración, como evidencia de su crecimiento.

Conclusiones

La determinación del perfil de temperatura y el cálculo de los valores de Fo acumulado, en cada sección de un fermentador, permite conocer y evaluar la efectividad del proceso de esterilización, así como la letalidad que se obtiene durante el ciclo.

En aquellos sistemas, como vasos o cámaras, que poseen un lazo de control de temperatura se alcanza una homogeneidad notable durante el proceso. Por otra parte, los sistemas que emplean vapor fluente son mucho más sensibles a las variaciones de la presión del vapor y a la duración del ciclo, especialmente en los casos en que esta última se controla de forma manual.

En todas las secciones estudiadas, el proceso de esterilización brinda suficiente letalidad para eliminar cualquier forma de vida microbiana. Particularmente en el vaso del fermentador el reto con bioindicadores confirmó estos resultados.

Este procedimiento puede ser igualmente aplicado a otros equipos, como es el caso de los reactores, siempre que exista un puerto de acceso que brinde la posibilidad de penetrar en el interior del vaso.

Referencias

1. Groves MJ, Murty R. *Aseptic Pharmaceutical Manufacturing II*. USA: Interpharm Press Inc; 1995.
2. Baseman, HJ. SIP/CIP Validation. *Pharmaceutical Engineering*, 1992; 12 (2):37-46.
3. Carleton FJ, Agalloco JP. *Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes*. USA: Marcel Dekker Inc; 1986.
4. Denyer S, Baird R. *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals*. UK: Ellis Horwood; 1990.
5. Avallone HL. Sterility retesting. *Journal of Parenteral Science and Technology*. 1986; 40 (2):56-57.
6. Parenteral Drug Association. *Moist Heat Sterilization in Autoclaves*, Technical Monograph No. 1, Draft #10. USA: Parenteral Drug Association; 2000.
7. Lydersen BK, D'Elia NA. *Bioprocess Engineering: System, Equipment and facilities*. USA: Wiley-InterScience; 1994.
8. Keenan JH, Keyes FG. *Steam Tables—Thermodynamics properties of water including vapor, liquid and solid phases*. USA: Wiley-InterScience; 1978.
9. Pflug I J. Discussion of the Z-value to use in calculating the F₀-value for high-temperature sterilization processes.

- Journal of Parenteral Science and Technology*, 1996; 50 (1):51-54.
10. Parenteral Drug Association. European Forum; Steam Sterilization & Parametric Release *Science and Regulation*. Basel, PDA, 1999.
 11. Kerlin TW, Shepard RL. *Industrial Temperature Measurement*. USA: Instrument Society of America; 1982.
 12. McBride RJ. *The F₀ Concept , Tutorial No. 1*. UK: Parenteral Society; 1993.
 13. Browne HJ, Olsson KI. Discussion of Control Systems in Pharmaceutical Manufacturing. *Pharmaceutical Engineering*. 1998; 18 (4):84-92.
 14. Marks DM. An Integrated Approach to CIP/SIP Design for Bioprocess Equipment. *Pharmaceutical Engineering*. 1999; 19 (2):34-45.
 15. Stadler EL, David M. Dual Purpose Fermentor and Bioreactor? A Capital Quandary!. *Pharmaceutical Engineering*. 1998; 18 (3):74-84.

Determination of the accumulated Fo during saturated steam sterilization cycles in a fermentor used for vaccine production

Abstract

Technical literature related to sterilization processes in industrial equipment was reviewed. The Fo concept was described and its application for evaluating the efficiency of the sterilization process in a fermentor. The temperature profile in different sections of the fermentor was studied during the sterilization cycles. After the application of some modifications, a reliable SAL was obtained in all sections of the fermentor.

Keywords: Sterilization process, validation, fermentors, reactors.

☛ II Simposio de Calidad “FIDCAL 2001”

El II Simposio de Calidad, convocado por la Dirección de Calidad y las BTJ del Instituto Finlay, tendrá lugar el 31 de octubre del 2001, en el área de Virales, en el marco de la celebración del Mes de la Calidad.

Este evento, cuya primera edición tuvo lugar el pasado año, tiene como finalidad mostrar los avances, aportes y resultados de la labor realizada por profesionales, técnicos y trabajadores de las diferentes áreas que integran nuestra Institución y que tengan una relación directa con la CALIDAD de los productos, en cuya investigación, desarrollo y fabricación nos encontramos enfrascados, así como de los servicios brindados por algunas áreas de nuestro Instituto.

La presentación de los trabajos se hará en forma de pósters, los cuales serán expuestos por sus respectivos autores. También se ofrecerán conferencias y finalmente se premiarán los mejores trabajos.

Las temáticas a abordar son las siguientes:

- Calidad en la investigación y desarrollo de nuevos productos y técnicas analíticas.
- Calidad en la manipulación y control de cepas.
- Calidad en los procesos de fabricación (incluyendo los almacenes)
- Calidad en los servicios técnicos ingenieros.
- Inspección y control de procesos.
- Control de la calidad.
- Calidad en la capacitación.
- Calidad en la información.
- Calidad en los servicios de apoyo: economía, personal, transporte, cocina-comedor, vigilancia, etc.
- Calidad en el manejo de animales de laboratorio.
- Calidad en la documentación.
- Calidad en los ensayos clínicos.
- Bioseguridad.