

Validación del proceso de esterilización con calor húmedo para radiofármacos y materiales

Anita Robles*, Mariel Moore, Mario Morote, Buenaventura Guevara, Delcy Castro,
Wilson Paragulla, Ramos Martínez, Elías Ocaña, Carlos Novoa

Dirección de Producción, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

Se ha diseñado y aplicado un protocolo de validación para el proceso de esterilización de radiofármacos y materiales, mediante calor húmedo para soluciones inyectables de Pertechnetato de Sodio Tc 99m (placebo) y de materiales en cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos. Se desarrolló el ciclo de esterilización establecido para cada carga, de acuerdo con los siguientes parámetros: temperatura $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, presión 15 ± 0.5 psi y tiempo de exposición de 20 y 15 minutos, respectivamente. Los resultados en la prueba de penetración con carga los valores F_0 fueron mayores a 20 minutos a 121°C y para el desafío biológico, mediante indicadores biológicos (esporas de *Bacillus stearothermophilus*) fue negativo en puntos más fríos, en tres corridas consecutivas. El proceso de esterilización para cada carga y equipamiento ha quedado validado por cumplir los criterios de aceptación establecidos.

Abstract

A validation protocol has been designed and applied for the sterilization process of radiopharmaceuticals and materials, with humid heat for sodium pertechnetate Tc-99m injection solution (placebo) and materials, in compliance with good manufacturing practices for pharmaceutical products. The sterilization cycle set for each load is developed, according to the following parameters: $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperature), 15 ± 0.5 psi (pressure) and an exposure time of 20 and 15 minutes, respectively. The results in the penetration test with load, F_0 values were higher than 20 minutes at 121°C and for the biological challenge by biological indicators (*Bacillus stearothermophilus*) was negative in colder spots, in three consecutive runs. The sterilization process for each load and equipment has been validated to meet the established acceptance criteria.

1. Introducción

De acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura de productos farmacéuticos (BPM) los procesos de esterilización deben ser validados. La esterilización por calor húmedo produce la letalidad de los microorganismos mediante coagulación de sus proteínas celulares (ADN) en soluciones acuosas y materiales termoestables y no sensibles a la humedad [1]. Para controlar este proceso debe tenerse en cuenta parámetros como la temperatura, presión y tiempo en una cámara de autoclave.

Cuando se esteriliza materiales termoestables por el método de esterilización terminal, se puede adoptar el proceso de sobremuerte bacteriana (Overkill) para asegurar un nivel de seguridad alto, independientemente del número y la resistencia al calor de los microorganismos en la carga [2,3]. Se caracteriza por el valor F_0 (tiempo de muerte), se encuentran valores altos de F_0

pero solo se considera el valor mínimo de F_0 que es el que proporciona al menos una reducción de 12-log del microorganismo con un valor D de un minuto a 121°C . Un cálculo rápido en base a la temperatura y tiempo sería lograr un F_0 igual 12 minutos como mínimo en un proceso Overkill [4,5].

En el presente trabajo se ha diseñado un protocolo de validación del procedimiento de esterilización por calor húmedo para los radiofármacos (soluciones inyectables) y materiales, sobre la base de principios y conceptos básicos de validación establecidos en las guías de la USP y OMS [2,6]; así como experiencia en la tecnología del proceso de esterilización y áreas limpias.

2. Metodología

Para realizar la validación del procedimiento de esterilización terminal, previamente se ha

*Correspondencia autor: arobles@ipen.gob.pe

desarrollado la calificación de la instalación y operación de cada equipo, cumpliéndose las especificaciones del fabricante y del usuario.

Sobre la base de la calificación anterior se ha realizado la validación del proceso de esterilización por calor húmedo, mediante la elaboración del protocolo de validación de tipo concurrente.

En la validación del proceso de esterilización por calor húmedo de radiofármacos y materiales de partida empleados en la fabricación de los mismos, se realizaron las pruebas de penetración con y sin desafío biológico para cada modelo de carga y equipo, y se establecieron los criterios de aceptación para considerarlo como un proceso validado, con las siguientes acciones en dos autoclaves identificadas como A1 y A2.

2.1 Selección de la carga

La carga seleccionada es la denominada “peor caso” para cada autoclave:

Autoclave horizontal (A1) con carga 1(Q1)
Radiofármacos, soluciones inyectables:

- 40 viales precintados con capacidad de 10 mL, se ha colocado solución fisiológica como placebo del NaTcO₄-Tc 99m, por la alta tasa de dosis radiactiva del radiofármaco.

Autoclave vertical (A2) con carga 2(Q2):

Materiales para la producción de radiofármacos:

- 02 beaker de 500 cc con 110 unidades de tapones llanos de clorobutilo, cada uno.
- 02 tapas de polipropileno para frasco.
- 02 frascos de 250 cc vacíos.
- 01 caja metálica con filtro para gases y conexiones de neopreno.
- 03 frascos c/tapa de 1000 cc con 1 L de agua bidestilada, en cada frasco.
- 04 viales con tapón y precinto de aluminio de 100 cc con 80 mL de agua bidestilada, cada uno.

2.2 Prueba de penetración con calor húmedo

Primera etapa: Para monitorear la temperatura se colocó junto a la carga máxima (peor caso) un mínimo de 10 sensores de temperatura calibradas y

verificadas (termocuplas), seguido de un proceso de esterilización por tres veces consecutivas, de acuerdo con el protocolo establecido. Los puntos fríos son detectados en esta etapa.

Segunda etapa: Identificado el punto(s) más frío en la carga de la etapa anterior, se procede a realizar el desafío microbiológico, colocando indicadores biológicos *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 en la cámara de la autoclave junto a los sensores ubicados en los puntos fríos. Nuevamente se realizó el proceso de esterilización por tres veces consecutivas.

En esta etapa se evaluó la resistencia térmica del indicador biológico (IB), caracterizado por el valor F₀, que se calculó en base a las mediciones de temperatura/tiempo con la siguiente fórmula:

$$F_0 \text{ acumulado} = \sum \left(10^{\frac{(t-T)}{Z}} \right) \cdot L$$

Dónde:

t: Temperatura en el instante de la lectura

T: Temperatura base (121 °C)

Z: Incremento de la temperatura requerido para cambiar el valor de D en una unidad logarítmica. Se asume el valor Z del certificado de análisis del fabricante

L: Intervalo de lectura (en minutos)

a) Datos del indicador biológico utilizado para el desafío microbiológico

IB: Esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

Carga Q1

Marca: Sterikon Plus

Población: 1 x 10⁶ esporas /unidad

F₁₂₁: 15 minutos (tiempo de muerte)

Carga Q2

Marca: MagnaAmp

Población: 1.7 x 10⁵ esporas / unidad

F₁₂₁: 15.75 minutos (tiempo de muerte)

b) Datos del termómetro digital multicanal

Carga Q1- A1

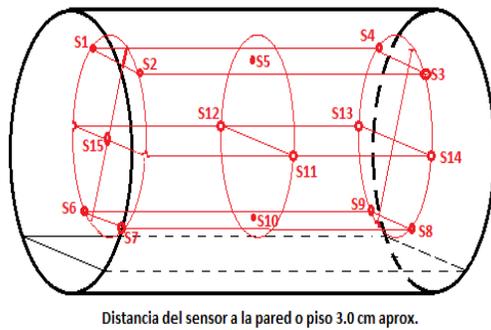
Marca Fluke modelo 2640A

Sensor: Termocuplas tipo T (T01 al T15)

Carga Q2-A2

Marca Digi-Sense Modelo 92000-05

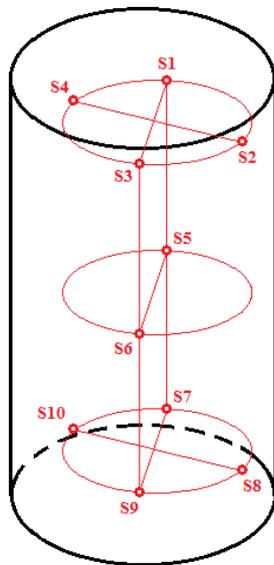
Sensor: Termocuplas tipo T (T01 al T10)



Distancia del sensor a la pared o piso 3.0 cm aprox.

N° Termocupla	Carga Q1 –A1
Nivel principal – Adelante	
S1, S2, S5, S6, S7, S10, S11, S12, S15	16 viales precintados de 10 mL de capacidad conteniendo suero fisiológico como placebo, colocados en una bandeja cribada cuadrada de acero inoxidable.
Nivel principal – Fondo	
S3, S4, S8, S9, S13, S14	24 viales precintados de 10 mL de capacidad con suero fisiológico, colocados en una bandeja cribada circular de acero inoxidable.

Figura 1. Ubicación de termocuplas y configuración de la carga Q1, cámara interna Autoclave A1.



Distancia del sensor a la pared o piso 3,0 cm aprox.

N° Termocupla	Carga Q2 –A2
Segundo nivel	
S1	Frasco de 1000 cc con agua bidestilada (1 L)
S2	Frasco 250 cc vacío
S3	Frasco 250 cc vacío
S4	Sin carga (control negativo)
S5	Frasco de 1000 cc con agua bidestilada (1 L)
S6	Frasco de 1000 cc con agua bidestilada (1 L)
Primer nivel	
S7	Beaker de 500 cc con 110 tapones llanos
S8	Beaker de 500 cc con 110 tapones llanos
S9	Caja metálica
S10	4 Viales de 100 cc con agua bidestilada (80 mL)

Figura 2. Ubicación de termocuplas y configuración de la carga Q2, cámara interna Autoclave.

2.3 Plan de muestreo

Se colocaron indicadores biológicos —como mínimo— en los puntos más fríos detectados durante las pruebas de penetración de calor en la carga respectiva. Especificaciones técnicas:

a) Parámetros del proceso de esterilización:

Carga Q1 –A1

Temperatura: $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Presión: $15 \pm 0,5$ psi

Tiempo: 20 min

Carga Q2 –A2

Temperatura $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Presión 15 ± 0.5 psi

Tiempo 15 min

b) Controles físico-químicos:

Penetración del calor $F_0 \geq 15$ minutos equivalentes a 121°C

c) Controles microbiológicos:

I.B. para la carga Q1 Sterikon Plus

I.B. para la carga Q2 MagnaAmp

Al término del período de incubación de los I.B. se interpreta de la siguiente manera:

- Indicador biológico de color morado o violeta, si vira a amarillo el resultado es positivo y sin viraje el resultado es negativo.
- Control positivo, no se esteriliza y vira a amarillo.

– Control negativo, se esteriliza y sin viraje de color (morado o violeta).

2.4 Método de análisis de la muestra

Los I.B. esterilizados y no esterilizados (Control positivo) son incubados entre 55°C a 62° C por 48 horas, en una incubadora calibrada para la temperatura de incubación, según instrucciones del fabricante. El I.B. marca Sterikon Plus no presenta control negativo.

2.5 Criterio de aceptación

El proceso de esterilización queda validado, si el resultado de las tres repeticiones (corridas) por cada prueba y carga está conforme a las especificaciones establecidas y si el monitoreo térmico nos indica que el proceso es reproducible.

3. Resultados y Discusión

Publicaciones acerca de la validación del proceso de esterilización por calor húmedo aplicado a las soluciones radio farmacéuticas aún no han sido publicados; se conoce los lineamientos y principios publicados por la USP y OMS [2,6], pero como realizarlo

–Protocolo de Validación– es propio de cada fabricante en función del equipo y la carga a esterilizar.

En la prueba de desempeño, se ha cumplido con el ciclo de esterilización según los parámetros establecidos para cada configuración de carga:

Para la carga Q1 en la autoclave A1; temperatura de 121°C ± 1°C por 20 minutos a una presión de 15,0 ± 0,5 psi, según las condiciones de operación del equipo y configuración de carga, Figura 3; se detectaron 2 puntos fríos en las posiciones S1 y S11 (Tabla 1). Los valores F₀ en la prueba de penetración con la carga Q1 fueron superiores a 20 minutos siendo el límite mínimo de F₀ 15 minutos acumulados para 121°C para el indicador biológico Sterikon plus, Tabla 2. Los indicadores biológicos ubicados en las posiciones S1 y S11 -sometidos a esterilización- no mostraron crecimiento microbiano, el control positivo -no esterilizado- viró de color morado a amarillo como signo de crecimiento microbiano (Tabla 3).

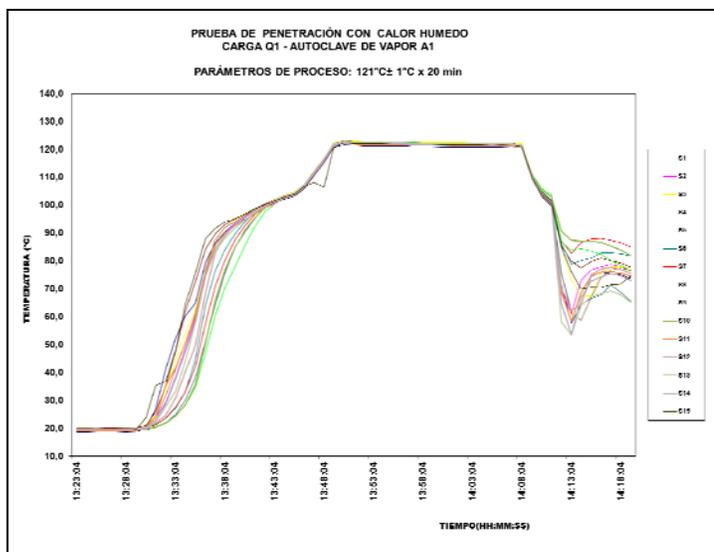


Figura 3. Monitoreo de la prueba de penetración con carga Q1 – Autoclave A1.

Para la carga Q2, en la autoclave A2, temperatura de 121°C ± 1°C por 15 minutos a una presión de 15,0 ± 0,5 psi, según las condiciones de operación del equipo y configuración de la carga, Figura 4; se detectaron 4 puntos fríos en las posiciones

S1, S5, S6 y S8, Tabla 4. Los valores F₀ en la prueba de penetración con la carga Q2 fueron superiores a 28 minutos siendo el límite mínimo de F₀ 15.75 minutos acumulados para 121°C para el indicador biológico MagnaAmp, Tabla 5. Los indicadores

biológicos ubicados en las posiciones S1, S5, S6 y S8 –sometidos a esterilización– no mostraron crecimiento microbiano; el control positivo –no esterilizado– viró de color morado a amarillo como signo de crecimiento microbiano y el control negativo –esterilizado– no viró de color (Tabla 6).

Los valores de F_0 obtenidos en cada uno de las posiciones estudiadas, en las 3 corridas consecutivas, indican que el proceso de esterilización brinda suficiente letalidad para eliminar la carga microbiana potencialmente presente en las soluciones inyectables de radiofármacos y materiales esterilizados.

Tabla 1. Prueba de penetración con calor húmedo con la cámara llena, carga Q1.

Corrida N°	Temperatura promedio °C, corregida, en cada posición del sensor															T °C máx.	T °C mín.
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15		
1	121.2	122.3	122.8	122.5	122.5	122.3	122.5	122.0	122.5	122.3	121.6	122.1	122.4	122.0	121.9	122.5	121.2
2	120.9	122.0	122.5	122.2	122.2	122.0	122.1	121.6	122.2	122.0	121.2	121.6	121.9	121.5	121.3	122.5	120.9
3	121.1	122.1	122.5	122.2	122.2	122.0	122.1	121.7	122.2	122.1	121.2	121.6	121.9	121.6	121.3	122.5	121.1

Especificación técnica: 121°C ± 1°C

❖ Puntos fríos en las posiciones S1 y S11.

Tabla 2. Valor F_0 en la prueba de penetración con la carga Q1 – Autoclave a vapor A1.

Corrida N°	F_0 min equivalentes acumulado a 121°C	F_0 minutos equivalentes acumulado a 121°C en cada posición														
		F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F010	F011	F012	F013	F014	F015
1	≥ 15 min	20.44	29.39	33.24	30.52	30.85	30.09	31.08	24.88	30.81	29.35	23.77	25.56	29.46	26.10	25.18
2		21.02	30.25	34.31	31.62	32.04	31.45	32.18	25.88	32.14	30.22	24.81	27.14	30.74	27.29	25.42
3		21.74	32.43	36.43	34.11	34.51	33.84	34.65	27.79	34.56	32.26	25.72	27.67	30.59	27.67	26.05

Tabla 3. Resultados de los controles microbiológicos para la carga Q2 – autoclave a vapor A2.

Corrida No	Lectura del indicador biológico		
	S1	S11	Control (+)
1	Negativo	Negativo	Positivo
2	Negativo	Negativo	Positivo
3	Negativo	Negativo	Positivo

❖ Los I.B. Sterikon plus fueron colocados en las posiciones S1 y S11 (Figura 1).

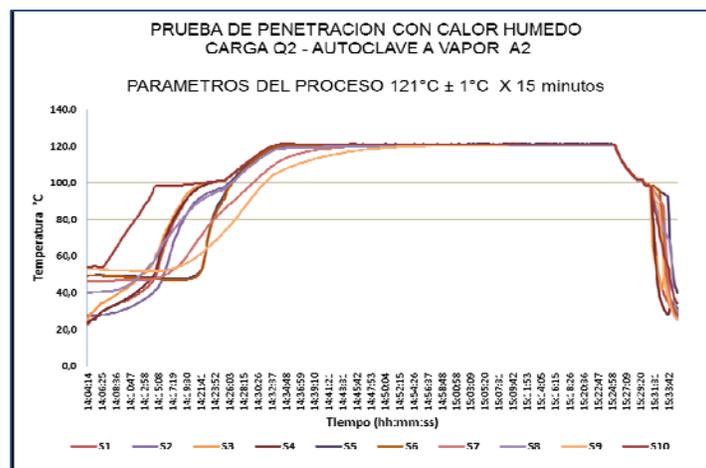


Figura 4. Monitoreo de la prueba de penetración con carga Q2 – Autoclave A2.

Tabla 4. Prueba de penetración con calor húmedo con la cámara llena, carga Q2.

Corrida N°	Temperatura promedio °C, corregida, en cada posición del sensor										T °C máx.	T °C mín.
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	120.7	120.8	121.2	120.9	120.7	120.7	120.8	120.7	120.8	120.9	121.3	120.0
2	120.7	120.8	121.1	120.8	120.7	120.6	120.7	121.0	120.8	120.9	121.3	120.0
3	120.7	120.8	120.9	120.8	120.7	120.7	120.7	121.1	121.4	120.8	121.5	120.0

Especificación técnica: 121°C ± 1°C

❖ Puntos fríos en las posiciones: S1, S5, S6 y S8.

Tabla 5. Valor F₀ en la prueba de penetración con la carga Q2 – Autoclave A2.

Corrida N°	F ₀ min equivalentes acumulado a 121°C	F ₀ minutos equivalentes acumulado a 121°C en cada posición									
		F ₀₁	F ₀₂	F ₀₃	F ₀₄	F ₀₅	F ₀₆	F ₀₇	F ₀₈	F ₀₉	F ₀₁₀
1	≥ 15 min	28.5	39.3	43.2	40.7	29.5	29.3	25.1	27.1	37.7	41.7
2		28.5	38.7	41.4	41.0	30.3	28.5	24.3	36.1	39.7	41.4
3		29.1	38.5	37.0	41.1	30.3	29.3	27.2	37.7	44.4	40.4

Tabla 6. Resultados de los controles microbiológicos, para la carga Q2 – Autoclave A2.

Corrida N°	Lectura del indicador biológico					
	S1	S5	S6	S8	S4 Control (-)	Control (+)
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

❖ Los I.B MagnaAMP fueron colocados en las posiciones S1, S5, S6 y S8. El control negativo en la posición S4 (Figura 2).

4. Conclusiones

El proceso de esterilización por calor húmedo en las autoclaves A1 para la carga Q1 y A2 para la carga Q2, cumplen con las especificaciones y criterios de aceptación establecido en el protocolo de validación. Asimismo, no presentaron ninguna desviación durante el proceso de validación en las autoclaves A1 y A2 para las cargas Q1 y Q2, respectivamente.

El proceso de esterilización por calor húmedo para las cargas Q1 y Q2 puede ser optimizado porque se ha determinado valores F₀ superiores al límite establecido en la USP (F₀ ≥ 12 min).

Los procesos de esterilización por calor húmedo aplicado a las soluciones de Pertecnetato de Sodio Tc99m y a los materiales por esterilización terminal queda validado, para cada equipo y configuración carga, respectivamente.

5. Agradecimientos

Al personal de mantenimiento y al Ing. Max Medina, por haber dado las pautas para la calificación de las autoclaves. A los proveedores que brindaron asesoramiento en

sus servicios como calibración y calificación de equipos térmicos.

6. Bibliografía

- [1] Iturralde JP. Fabricación de productos estériles (I): Esterilización y esterilidad. Industria Farmacéutica. 1999; 14(1): 41-51.
- [2] U.S. Pharmacopeial Convention. USP 36 <1211>. Esterilización y garantía de Esterilidad de artículos farmacopeicos. 2014: 951-952.
- [3] Agalloco J, Carleton F, (Eds.). Validation of pharmaceutical processes. 3rd. New York: CRC Press. 2007. p. 180-192.
- [4] Syed I. Pharmaceutical master validation plan. Informa Healthcare. 2002: 148-149.
- [5] Parenteral Drug Association (PDA). Validation of steam sterilization cycles. Technical Monograph N° 1. Philadelphia, PA: Parenteral Drug Association, 1978.
- [6] World Health Organization. Technical Report Series N° 957, Anexo 4: 222-223. 2010
- [7] Pharmaceutical Processes. 3rd edition. 2007: 180-192.
- [8] Lewis R. Practical guide to autoclave validation. Pharmaceutical Engineering. 2002 July-August 2002; 22(4).