

Validación del método de limpieza y sanitización para recintos de producción de radiofármacos

Anita Robles*, Mario Morote, Mariel Moore, Delcy Castro, Wilson Paragulla, Carlos Novoa, Manuel Otero, Jesús Miranda, Jorge Herrera, Luis Gonzáles

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

Resumen

Se ha diseñado y desarrollado un protocolo de validación para el método de limpieza y sanitización de la superficie interior de los recintos de producción de Pertecnato de sodio Tc-99m y EDTMP-Sm 153, considerando una situación extrema para cada recinto. La limpieza se realizó con agua bidestilada y la sanitización con dos soluciones desinfectantes, alcohol Isopropílico 70 % y peróxido de hidrógeno 3 % alternadas semanalmente. Se hicieron análisis microbiológicos de las superficies sanitizadas después de 20 minutos y 48 horas para el recinto de Tc-99m y 72 horas para el recinto de EDTMP-Sm 153 en 3 pruebas consecutivas, mediante el método de contacto directo con placas que contiene medio de cultivo, efectuada para cada punto de muestreo (6 en el primero y 5 en el segundo). Los resultados evidenciaron que la carga microbiana en las superficies sanitizadas estuvo por debajo de los límites de aceptación y que el tiempo de vigencia de la limpieza y sanitización es de 48 horas para el recinto de Tc-99m y 72 horas para el EDTMP-Sm153. Se concluye que el método de limpieza y sanitización es efectivo para la reducción o eliminación de la contaminación microbiana, el proceso está validado.

Validation of the cleaning and sanitization method for radiopharmaceutical production facilities

Abstract

A protocol for the cleaning and sanitization method for radiopharmaceutical production facilities has been designed and developed for the inner surface of the hot cells for the production of Sodium Perchnetate Tc-99m and Sm-153 EDTMP, considering an extreme situation for each hot cell. Cleaning is performed with double-distilled water and sanitation with two disinfectant solutions, 70 % isopropyl alcohol and 3 % hydrogen peroxide in alternate weeks. Microbiological analysis of sanitized surfaces were made after 20 minutes and 48 hours for the hot cell of Tc-99m and 72 hours for the hot cell of EDTMP Sm-153 in 3 consecutive tests by the method of direct contact with plates containing culture medium, made for each sampling point (6 in the first and five in the second). The results showed that the microbial load on surfaces sanitized was below acceptable limits and that the lifetime of cleaning and sanitization is 48 hours for the hot cell of Tc-99m and 72 hours for the one of EDTMP-Sm153. As a conclusion, the method of cleaning and sanitization is effective to reduce or eliminate microbial contamination therefore, the process is validated.

1. Introducción

De acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) es importante el saneamiento de manera completa y con cierta frecuencia de los recintos de producción (*Hot cell*) que se utilizan en la producción de radiofármacos [1]. La norma señala que cuando se emplea desinfectantes deben usarse más de un tipo alternándolos regularmente, además deben efectuarse controles microbiológicos periódicos a fin de evaluar la reducción de la carga microbiana y detectar cepas de microorganismos resistentes.

Por principio, cada recinto de producción (*Hot cell*) se constituye en un equipo

exclusivo para la producción de un radiofármaco, por lo que no es necesario determinar trazas del ingrediente principal activo (Tc-99m o Sm-153), a excepción de los datos del desinfectante y carga microbiana que pueda estar presente después de la sanitización de la superficie de contacto como techo, paredes, compuertas y piso en el interior del recinto. El método de limpieza y sanitización debe ser validado para demostrar su eficacia y efectividad [2, 3].

En este trabajo se ha diseñado y desarrollado

*Correspondencia autor: arobles@ipen.gob.pe

un protocolo para la validación del método de limpieza y sanitización para recintos de producción de radiofármacos, sobre la base de los resultados de la evaluación de la efectividad de las soluciones desinfectantes utilizadas, con el objetivo de demostrar que el proceso de limpieza y sanitización aplicado a los recintos de producción de Pertecnetato de Sodio Tc 99m y EDTMP-Sm 153, es eficaz para mantener dentro de los límites de aceptación microbiológica .

2. Metodología

Para realizar la validación del método de limpieza y sanitización, previamente un laboratorio especializado ha evaluado la

efectividad de los desinfectantes preparados en la Planta de Producción de Radioisótopos (PPRR). Los parámetros evaluados fueron: concentración del agente desinfectante y tiempo de contacto sobre la superficie, enfrentándolas a cuatro grupos de cepas microbianas preparados comercialmente y con certificación ATCC a fin de determinar el tiempo de exposición óptimo para cada desinfectante empleado, estos trabajos *in vitro* se han reportado en informes técnicos según método microbiológico descrito por Palao M, *et al.* [4]. En la Tabla 1 se muestran los resultados del efecto antimicrobiano de las soluciones desinfectantes versus tiempo de contacto sobre superficies contaminadas.

Tabla 1. Acción del desinfectante sobre cepas microbianas, en función del tiempo y concentración.

Desinfectante	Tiempo de contacto	Cepa microbiana	Concentración inicial del microorganismo en la muestra. ufc/mL	Resultados
Alcohol isopropílico al 70%	10, 20 y 30 minutos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (Bacteria Gram Positiva)	47 x 10 ⁶	Se observó una inhibición promedio de > al 99% (< 1 UFC/mL) de los microorganismo ensayados en los tres tiempos evaluados
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (Bacteria Gram Negativa)	15 x 10 ⁷	
		<i>Candidaalbicans</i> ATCC 10231 (levadura)	50 x 10 ⁵	
		<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (Hongo filamentoso)	10 x 10 ⁵	
Peróxido de hidrógeno al 3%	10 y 20 minutos, y 48 horas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (Bacteria Gram Positiva)	20 x 10 ⁶	Se observó una inhibición promedio de > al 99% (< 1UFC/mL) de los microorganismos ensayados, solo a los 20 min y 48 horas.
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (Bacteria Gran Negativa)	70 x 10 ⁶	
		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (levadura)	16 x 10 ⁵	
		<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (Hongo filamentoso)	10 x 10 ⁵	

Sobre la base de estos resultados se realizó la validación de la limpieza y sanitización de tipo concurrente después de finalizado el proceso de producción en cada recinto (Pertecnetato de Sodio Tc-99m o EDTMP-Sm-153) y antes de iniciarse la siguiente producción; paralelamente, el control del riesgo radiológico del operador estuvo bajo la supervisión del Oficial de Protección Radiológica.

De acuerdo con el protocolo la validación se desarrollaron las siguientes etapas:

- Limpieza y sanitización del recinto de producción, según procedimiento establecido.
- Evaluación microbiológica de las superficies sanitizadas.
- Evaluación del tiempo de vigencia de la limpieza y sanitización.
- Plan de muestreo.
- Método de ensayo microbiológico.

f) Criterio de aceptación.

2.1. Limpieza y sanitización del recinto de producción

Un diagrama de flujo esquematiza la secuencia de los pasos de limpieza y sanitización aplicado a cada recinto de producción, para un grado de limpieza normal efectuado en forma manual por personal entrenado; cumpliendo con las normas de protección radiológica (Figura 1).

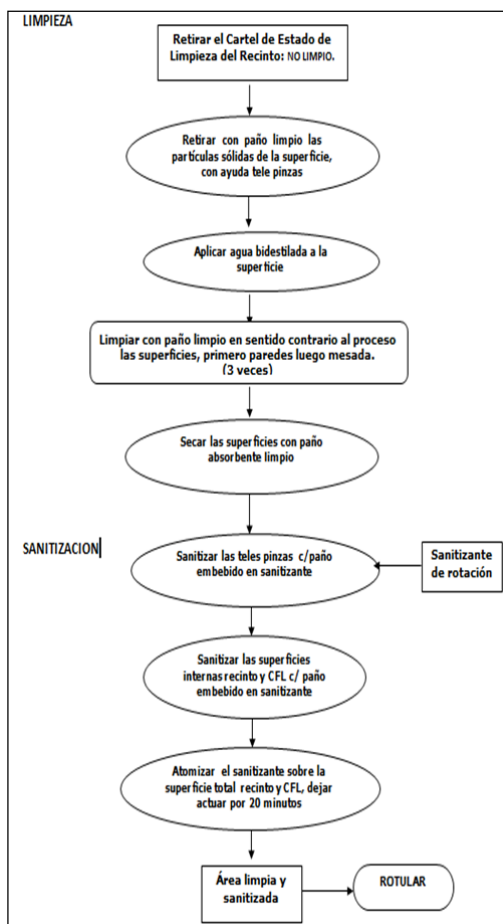


Figura 1. Flujograma del proceso de limpieza y sanitización del recinto de producción.

2.1.1 Equipamiento

Los recintos se encuentran clasificados y calificados como áreas limpias Grado C de acuerdo con los procedimientos del laboratorio y guía de la Organización Mundial de Salud (OMS). El recinto de acrílico está blindado con plomo de 50 mm de espesor, cuenta con visores de vidrio plomado y es operado manualmente a través de telepinzas. Cuenta con un sistema de tratamiento del aire (filtro HEPA) que

garantiza la calidad del aire. En su interior se encuentra instalada una mini cabina de flujo laminar CFL de Grado A para el envasado del radiofármaco. Radiológicamente el interior del recinto está clasificado como zona controlada (Figuras 2 y 3).



Figura 2. Imagen del recinto de producción Tc-99m, vista frontal.



Figura 3. Imagen del recinto de producción Tc-99m, vista interior.

2.1.1.1 Recinto de producción de Pertecnetato de sodio Tc- 99m

Acceso: Cuenta con una esclusa para el ingreso material y salida del producto.

Techo y paredes: Construido en metacrilato de metilo (acrílico) con acabados que permiten la limpieza, no poroso, no rugoso y libre de rajaduras.

Mesada de trabajo: De acero inoxidable 304, liso, resistente a las condiciones de trabajo, libre de rajaduras y de juntas abiertas.

Luminarias y ductos de ventilación y otras líneas de servicio: Se encuentran fuera de la caja acrílica, sobre techo técnico, evitando así cualquier tipo de contaminación.

2.1.1.2 Recinto de producción de EDTMP-Sm 153

Acceso: Cuenta con dos puertas de acceso para el ingreso de materiales y salida del producto.

Techo y paredes: Construido en metacrilato de metilo (acrílico) con acabados que permiten la limpieza, no poroso, no rugoso y libre de rajaduras.

Mesada de trabajo: De PVC liso, resistente a las condiciones de trabajo, libre de rajaduras y de juntas abiertas.

Luminarias y ductos de ventilación y otras líneas de servicio: Se encuentran fuera de la caja acrílica, sobre techo técnico, evitando así cualquier tipo de contaminación.

2.2 Materiales

Para el estudio se utilizó como material, paño de limpieza (sintético absorbente) y como agente de limpieza agua bidestilada reciente (900 mL). Los agentes sanitizantes fueron preparados según programa de rotación semanal establecido, la primera semana Alcohol Isopropílico al 70 % (1000 mL), la segunda semana Peróxido de Hidrógeno al 3 % (1000 mL) y la tercera semana Alcohol Isopropílico al 70 % (1000 mL).

2.3 Evaluación microbiológica de superficies sanitizadas

Con el objetivo de comprobar la eficacia del método de limpieza y sanitización de las superficies internas del recinto de producción se realizó el control microbiológico de superficie en cada punto de muestreo, 20 minutos después de la sanitización para cada recinto (Figura 4).

2.4 Evaluación del tiempo de vigencia de la limpieza y sanitización

Con el objetivo de demostrar que después del proceso de sanitización el recinto permanece

por un tiempo de vigencia dentro de los límites microbiológicos, el recinto se mantuvo cerrado; luego, se realizó el control microbiológico de superficie en cada punto de muestreo 48 horas después de realizada la sanitización para el recinto de producción de Pertecnetato de Sodio Tc-99m y 72 horas después para el recinto de producción de EDTMP-Sm-153 (Figura 4).

2.5 Plan de muestreo

Los muestreos se realizaron en dos etapas para cada recinto de producción:

2.5.1 Recinto de Pertecnetato de sodio Tc 99m

- 20 minutos después de realizada la limpieza y sanitización.
- 48 horas después de la primera limpieza y sanitización y mantenido el recinto cerrado.

2.5.2 Recinto de EDTMP – Sm 153

- 20 minutos después de realizada la limpieza y sanitización.
- 72 horas después de la limpieza y sanitización y mantenido el recinto cerrado.

Los puntos de muestreo fueron seleccionados realizando un análisis de riesgo, sobre la base de los siguientes criterios:

- Contacto directo con el producto.
- Área difícil de limpiar.
- Cerca de las compuertas de ingreso/salida de materiales y de mantenimiento.

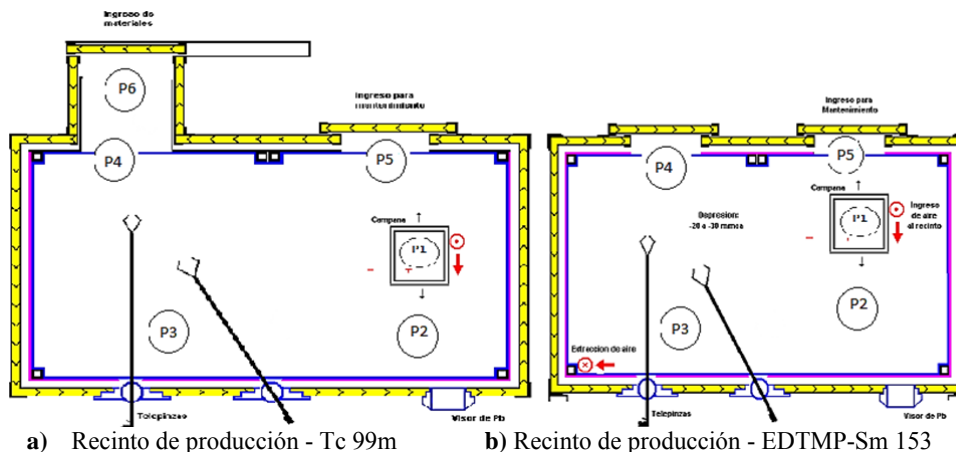


Figura 4. Esquema de los puntos de muestreo críticos en cada recinto de producción.

2.6 Método de ensayo microbiológico

Se realizó mediante el método de placas de contacto que contiene medio de cultivo con neutralizantes para desinfectantes, preparados comercialmente, previa evaluación del control de esterilidad antes de su uso. Para cada punto de muestreo el operador abre la tapa de la placa mediante una telepinza y hace contacto del medio de cultivo con la superficie a evaluar, luego tapa la placa, limpia el punto de muestreo con paño de gasa embebido con alcohol al 70 % para desinfectar la superficie evaluada. Después de monitorizar la tasa de dosis de radioactividad de las placas de contacto se lleva a incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para microorganismos aerobios y a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 5 días para hongos y levaduras. Finalmente se hace el recuento de colonias de cada placa y la evaluación correspondiente.

2.6.1 Materiales y equipamiento

Para el ensayo se utilizó placas de contacto para superficie de Agar CASO con neutralizantes (polisorbato 80: 5.0 g/l, Lecitina: 0.7 g/l, Histidina: 0.5g/l y Na-Tiosulfato 0.5g/l) y Agar Sabouraud, marca Merck-Heipha, con neutralizantes (Lecitina: 0.7 g/l, tween 80: 5 g/l, Histidina: 0.5 g/l y Na-Tiosulfato 0.5 g/l); las placas de contacto cuentan con certificados de análisis. Además las incubadoras utilizadas han sido calibradas en los rangos de temperaturas indicados en la metodología. Para el monitoreo radiológico

se utilizaron monitores de radiación y dosímetro personal de radiación calibrados.

2.6.2 Límites de aceptación

El Informe Técnico N° 44 de la OMS (2010, anexo 4) recomienda los límites de aceptación para contaminación microbiana en áreas y equipo limpio de manufactura. En la Tabla 2 solo se considera la cantidad de UFC por placa de contacto, indistintamente que desarrollen bacterias, hongos filamentosos o levaduras [5 y 6].

Tabla 2. Límites de aceptación recomendados para carga microbiana en equipo exclusivo limpio.

Clasificación de Área		Límite Aceptación UFC / placa de contacto (diam. 55mm)
ISO	Guía OMS	
ISO Clase 5	Grado A	< 1
ISO Clase 7	Grado C	≤ 25

ufc: unidades formadoras de colonia

2.7 Criterio de aceptación

El método de limpieza y sanitización es considerado validado si después de tres repeticiones consecutivas, cumple con los límites de aceptación para cada evaluación microbiológica de superficie sanitizadas y tiempo de vigencia de limpieza y sanitización[3].

Tabla 3. Etapa I: 20 minutos después de realizada la limpieza y sanitización - Recinto de Tc-99m.

Área	Punto muestreo	Superficie	Límite aceptación (ufc / placa de contacto)	Resultados (ufc / placa de contacto)		
				Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
CFL (Grado A)	P1	Mesada de la CFL	<1	0	0	0
Recinto (Grado C)	P2	Mesada, delante de la CFL	≤ 25	0	0	0
	P3	Mesada, delante compuerta posterior izquierda	≤ 25	0	0	0
	P4	Pared, compuerta posterior izquierda	≤ 25	1	0	0
	P5	Pared, compuerta posterior derecha	≤ 25	2	0	0
	P6	Mesada de la esclusa	≤ 25	3	12	1
Control Negativo	---	Control Negativo	Negativo	0	0	0

3 Resultados y Discusión

Se realizaron tres procesos de limpieza y sanitización consecutivos según programa de rotación semanal –intercalando desinfectante– para el recinto de producción de Pertecnetato de Sodio Tc 99m y EDTMP-Sm 153, respectivamente.

3.1 Recinto de producción de Pertecnetato de sodio Tc-99m

3.1.1 Evaluación microbiológica de superficies sanitizadas

3.1.2 Evaluación del tiempo de vigencia de la limpieza y sanitización

Tabla 4. Etapa II: 48 horas después de realizada la limpieza y sanitización, Recinto Tc-99m.

Área	Punto muestreo	Superficie	Límite aceptación (ufc / placa de contacto)	Resultados (ufc / placa de contacto)		
				Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
CFL (Grado A)	P1	Mesada de la CFL	<1	0	0	0
Recinto (Grado C)	P2	Mesada, delante de la CFL	≤25	0	0	0
	P3	Mesada, delante compuerta posterior izquierda	≤25	0	0	0
	P4	Pared, compuerta posterior izquierda	≤25	0	0	0
	P5	Pared, compuerta posterior derecha	≤25	0	0	0
	P6	Mesada de la esclusa	≤25	16	0	0
Control Negativo	---	Control Negativo	Negativo	0	0	0

- En la evaluación microbiológica de superficies del recinto de producción de Pertecnetato de Sodio Tc99m, 20 minutos después de la sanitización en las tres pruebas realizadas, se presentó crecimiento microbiano en los puntos de muestreos P4, P5 y P6, valores que se encuentran por debajo del límite de aceptación (≤ 25 ufc/placa, Grado C), la mesada de la cabina de flujo laminar CFL (Grado A) no presentó crecimiento bacteriano. Tabla 3.

- Para la determinación del tiempo de vigencia se realizó una evaluación microbiológica de superficies a las 48 horas después de la sanitización, no presentó crecimiento microbiano en las tres pruebas realizadas, a excepción de la primera prueba que salió en el punto de muestreo “P6” 16 ufc/placa, valor que se encuentra por debajo del límite de aceptación (≤ 25 ufc/placa, Grado C). Tabla 4.

- Se ha demostrado que el proceso de limpieza y sanitización realizado al recinto de producción de Pertecnetato de Sodio Tc 99m reduce la carga microbiana a niveles

aceptables, por debajo del límite de aceptación establecido para áreas limpias Grado A (CFL) y Grado C (recinto), a los 20 minutos y 48 horas postproceso.

3.2 Recinto de producción de EDTMP-Sm 153

3.2.1 Evaluación microbiológica de superficies sanitizadas

- En la evaluación microbiológica de superficies del recinto de producción de EDTMP-Sm 153, 20 minutos después de la sanitización no se presentó crecimiento microbiano en las tres pruebas realizadas, a excepción de la primera prueba que salió en el punto de muestreo “P3” 6 ufc/placa, valor que se encuentra por debajo del límite de aceptación (≤ 25 ufc/placa, Grado C). La mesada de la cabina de flujo laminar (Grado A) no presentó crecimiento bacteriano. Tabla 5.

Tabla 5. Etapa I: 20 minutos después de realizada la limpieza y sanitización. Recinto Edtmp-Sm-153.

Área	Punto muestreo	Superficie	Límite aceptación (ufc / placa de contacto)	Resultados (ufc / placa de contacto)		
				Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
CFL (GradoA)	P1	Mesada de la CFL	<1	0	0	0
Recinto (Grado C)	P2	Mesada, delante de la CFL	≤ 25	0	0	0
	P3	Mesada, delante compuerta posterior izquierda	≤ 25	6	0	0
	P4	Pared, compuerta posterior izquierda	≤ 25	0	0	0
	P5	Pared, compuerta posterior derecha	≤ 25	0	0	0
Control Negativo	--	Control Negativo	Negativo	0	0	0

3.2.2 Evaluación del tiempo de vigencia de la limpieza

Tabla 6. Etapa II: 72 horas después de realizada la limpieza y sanitización. Recinto Edtmp-Sm-153.

Área	Punto muestreo	Superficie	Límite aceptación (ufc / placa de contacto)	Resultados (ufc / placa de contacto)		
				Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
CFL (Grado A)	P1	Mesada de la CFL	<1	0	0	0
Recinto (Grado C)	P2	Mesada, delante de la CFL	≤ 25	0	0	7
	P3	Mesada, delante compuerta posterior izquierda	≤ 25	0	0	0
	P4	Pared, compuerta posterior izquierda	≤ 25	0	0	0
	P5	Pared, compuerta posterior derecha	≤ 25	0	0	0
Control Negativo	--	Control Negativo	Negativo	0	0	0

- Para la determinación del tiempo de vigencia se realizó una evaluación microbiológica de superficies a las 72 horas después de la sanitización, no se presentó crecimiento microbiano en las tres pruebas realizadas, a excepción de la segunda prueba que salió en el punto de muestreo "P2" 7 ufc/placa; valor que se encuentra por debajo del límite de aceptación (≤ 25 ufc/placa, Grado C). Tabla 6

- Se ha demostrado que el proceso de limpieza y sanitización realizado al recinto de EDTMP – Sm 153, reduce la carga microbiana a niveles aceptables, por debajo de los límites de aceptación establecida para áreas limpias Grado A (CFL) y Grado C (recinto); a los 20 minutos y 72 horas post-proceso.

3.3 La OMS [5], recomienda utilizar más de un sanitizante para áreas limpias y equipos, en este estudio se utilizaron dos soluciones sanitizantes, peróxido de hidrogeno al 3 % y alcohol Isopropílico al 70 %, ambas soluciones demostraron su efectividad para reducir o eliminar la contaminación microbiana de las áreas clasificadas como Grado A y C, debido a que todos los puntos muestreados cumplieron con los límites de aceptación. Asimismo, se comprobó la acción residual de los mismos sirviendo como antimicrobiano y previniendo la recontaminación, en cada recinto.

3.4 El método de limpieza de Baptista, aplicado en recintos de producción de radiofármacos [7], utiliza una solución sanitizante preparada a partir del Proxitane –

alpha(TechDesinfection®) al 20 %, la cual está compuesta por peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ácido acético y agua; mezcla sinérgica de amplio espectro de desinfección que no necesitaría ser rotado, los estudios preliminares evidencian su eficacia en la reducción y eliminación de la carga microbiana.

3.5 Los microorganismos desarrollados en las pruebas, tal como se indica en la Tabla 3, 4 y 5 no se han identificado, porque no es el objetivo del estudio de validación.

4 Conclusiones

4.1 El método de limpieza y sanitización aplicado al recinto de producción de Pertecnetato de Sodio Tc 99m es conforme en las tres pruebas realizadas y cumple con los límites de aceptación de superficies para áreas limpias, que permite asegurar la manufactura del radiofármaco; por consiguiente, el proceso queda validado y tiene una vigencia de 48 horas.

4.2 El método de limpieza y sanitización aplicado al recinto de producción EDTMP - Sm 153, es conforme en las tres pruebas realizadas y cumple con los límites de aceptación para áreas limpias, que permite asegurar la manufactura del radiofármaco; por consiguiente, el proceso queda validado y tiene una vigencia de 72 horas.

5 Agradecimientos

Se agradece al oficial de protección radiológica, Sr. Elías Ocaña, por su apoyo en la supervisión de las pruebas realizadas, al personal de mantenimiento y control de

calidad de la Planta de Producción de Radioisótopos.

6 Bibliografía

- [1] Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID). Manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos. Lima; 1999.
- [2] U.S. Pharmacopeial Convention (USP). Ambientes de procesamiento aséptico. USP 37 <1116>. 2014.
- [3] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guide to inspections validation of cleaning processes. 1993.
- [4] Palao M., Ortegón A, Giles M. Técnicas microbiológicas de aplicación en el control de calidad de alimentos. Apéndice C. Facultad de Química de la UNAM. 1998.
- [5] World Health Organization (WHO). WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation. Forty-fourth report Annex 4. WHO Technical Report Series N° 957. 2010.
- [6] International Organization for Standardization (ISO). ISO 14644-1 1999-Part 1: Classification of air cleanliness. Geéve, Suiza: ISO; 1999.
- [7] Baptista T, Batista V, Gomes A, et al. Efficiency of hydrogen peroxide for cleaning production areas and equipment in the radiopharmaceutical production. In: 2013 International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2013). Recife, Brazil, 24-29 november 2013.
- [8] Haider SI. Pharmaceutical master validation plan: The ultimate guide to FDA, GMP, and GLP compliance. CRC Press; 2002.