

Comparación de métodos estadísticos utilizados para el establecimiento de límites de control microbiológicos en áreas limpias

Kosara Sánchez Álvarez, Anelis Quintana Cantillo, Mario Mho González,* María Antonieta Tuñón y Fernando Porrero Martín.**

Departamento de Producción de Interferón Alfa Humano Leucocitario y Factor de Transferencia, *Departamento de Bioseguridad, **Departamento de Formulación y Envase, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Avenida 31 entre 158 y 190, Apartado Postal 6162, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 11 de octubre del 2000. Aceptado: 30 de abril del 2001.

Palabras clave: control ambiental, límites microbiológicos, análisis estadístico, evaluación de áreas limpias.
Key words: environmental monitoring, microbiological limits, statistical analysis, clean room evaluation.

RESUMEN. El control ambiental es un requerimiento esencial de la industria farmacéutica y los resultados que el fabricante obtiene de este, deben ser reproducibles y asegurar que el ambiente aséptico se encuentre bajo control. Actualmente, el productor de medicamentos debe demostrar que los límites de alerta y acción tienen una base estadística relacionada con el comportamiento histórico de las áreas de producción. Además del establecimiento de los límites para los conteos de partículas no viables, el control microbiológico en un programa de control ambiental de áreas de producción de parenterales es una de las herramientas más importantes para garantizar la seguridad de los productos y el establecimiento de límites de alerta y acción a partir de análisis estadísticos de datos históricos que pueden proporcionar los niveles de confiabilidad deseados. Usualmente, los límites microbiológicos se establecen sobre la base de porcentajes establecidos de las frecuencias acumuladas de datos históricos de conteos microbiológicos ambientales. Este trabajo compara este método tradicional con uno nuevo que no solo permite la determinación de los límites ambientales, sino también, la evaluación de los efectos de los controles en el ambiente del área de producción y propicia la selección de los puntos de mayor significación en aquellas de interés. Estos puntos fueron definidos por análisis de varianza de variables independientes de las ecuaciones lineales obtenidas del análisis de regresión de datos microbiológicos ambientales de las áreas de producción de Interferón Alfa Natural Humano y Factor de Transferencia.

ABSTRACT. Environmental monitoring is an essential requirement in the pharmaceutical industry. Results that the manufacturer obtains from environmental monitoring must be reproducible and assure that the aseptic environment is under control. Currently, the pharmaceutical manufacturer must demonstrate that the alert-action levels that have been established for the facility have a statistical basis related to the historical performance of the facility. Besides nonviable particle levels establishment, microbiological control in an environmental monitoring program of parenteral production areas is one of the most important tools for warranty of patients' safety and the establishment of alert and action levels from statistical surveys of historical data can provide the level of confidence desired. Usually microbiological levels are established on the basis of established percentages of cumulative frequencies of environmental microbiological historical data. This work compares this traditional method and a new one that not only permits environmental limit determination, but also the evaluation of the effects of controls on the manufacturing environment and propitiate the selection of points with significant influence in interesting areas. These points were defined by variance analysis of independent variables in linear equations obtained from regression analysis of microbiological environmental control data of natural Interferon Alpha and Transfer Factor production areas.

INTRODUCCION

Garantizar la seguridad de los pacientes y la calidad de los medicamentos que a ellos son suministrados, constituyen las principales preocupaciones para los productores de hemoderivados, en especial de los que se suministran en forma de inyectables. El control de las áreas de trabajo es una de las vías existentes para lograr un producto de elevada calidad, lo que a su vez precisa de un efectivo programa de control ambiental basado en la determinación de diferentes indicadores microbiológicos y otros como la cantidad de partículas totales, programas de rotación de desinfectantes y de limpieza y desinfección, etc., de las distintas áreas; todo ello con el objetivo de determinar límites y tipos de contaminación presentes, las fuentes de dicha contaminación y poder evaluar la efectividad de los procedimientos de limpieza e higienización.¹⁻³ Un importante componente dentro de este programa se corresponde con el establecimiento de los límites microbiológicos de alerta y de acción,⁴ por lo que el objetivo de este trabajo fue la comparación de dos metodologías de trabajo diferentes para su establecimiento en las áreas de producción del Interferón Alfa Natural Humano y del Factor de Transferencia, así como determinar aquellas variables más significativas y establecer ecuaciones lineales capaces de caracterizar el comporta-

miento microbiológico de los distintos locales.

MATERIALES Y METODOS

Para el establecimiento de los límites microbiológicos se realizó el análisis estadístico de datos tomados del Sistema de Control Ambiental de las áreas de producción de dos inyectables de uso en humanos, correspondientes a un período de tres años. Se agruparon en clases los registros para la determinación de los límites de unidades formadoras de colonias (UFC), se determinó la frecuencia acumulada y su porcentaje para las diferentes clases y se tomaron como los límites de alerta y de acción los valores correspondientes al 68 y al 95 % de la frecuencia acumulada respectivamente.⁴

Para la evaluación de partículas viables en el ambiente, se utilizaron placas que contenían triptona de soya agar (OXOID), las cuales fueron expuestas durante 1 h (Fig. 1), en un horario establecido de manera aleatoria, lo cual garantizó una mayor representación de todas las posibles variables a las que pudieron estar sometidos los productos en su elaboración (flujo de trabajo, cantidad de personas en el área, variedad de operaciones, etc.); e incubadas durante tres días de 30 a 32 °C, de acuerdo con la descripción de la técnica que aparece en la farmacopea.⁵

Simultáneamente, se analizaron las relaciones entre puntos de muestreo y actividades asociadas por la distribución espacial de los locales; así como por el trasiego que impone la organización productiva en cada uno de los casos, por lo que se prefijaron en cada local como variables dependientes aquellos puntos de muestreo con mayores requerimientos y el resto como variables independientes.

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el programa Statgraphic Plus Versión 2.1 1996 y mediante el empleo del método de regresión múltiple, se obtuvieron las ecuaciones lineales de relación entre las variables, que describen el comportamiento de los conteos microbiológicos para los diferentes locales (Ecuaciones 1).

De acuerdo con el análisis de varianza resultante, se determinaron las variables independientes significativas para cada área y las restantes fueron eliminadas, así como aquellos puntos cuyo comportamiento se desvió significativamente de la media.

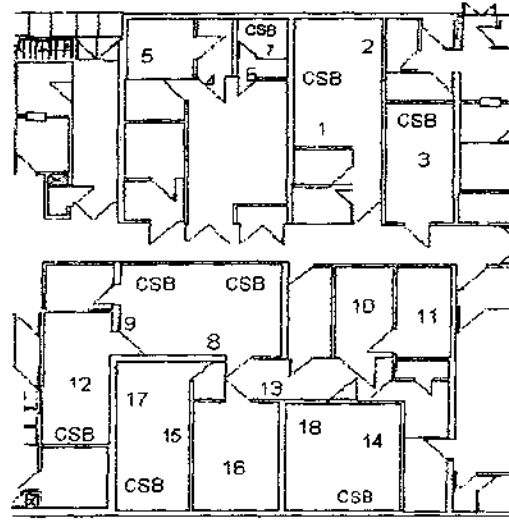


Fig. 1. Esquema del área de producción donde aparecen los diferentes puntos de muestreo. CSB: Cabina de seguridad biológica.

Finalmente, las nuevas bases de datos fueron analizadas mediante el método de regresión múltiple y se conformaron las ecuaciones finales que describen el comportamiento de cada área⁶ (Ecuaciones 2).

Como resultado de la evaluación de estas ecuaciones, en cada punto seleccionado, los límites de alerta y acción fueron definidos como el mínimo y el máximo de entre los valores calculados.

RESULTADOS Y DISCUSION

La producción del Interferón Alfa Humano Leucocitario, realizada

siguiendo el procedimiento descrito por Kari Cantell, implica la obtención colateral de aditivos como la preparación de virus Sendai inductor, replicado en embriones de pollo y del suero humano libre de gamma globulinas. Estos productos intermedios del proceso convergen en el área de inducción de Interferón Alfa Natural Humano. En este local también son purificados leucocitos humanos a partir de concentrados leucocitarios, obtenidos de sangre periférica de donantes voluntarios sanos. Estas células son cultivadas en un medio de cultivo que contiene suero hu

$$\text{Punto 2 (Area de Virología)} = A + B \cdot \text{Punto 1} - C \cdot \text{Punto 3} + D \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} + E \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2}$$

$$\text{Punto 7 (Area de Preparación de Disoluciones)} = F + G \cdot \text{Punto 4} - H \cdot \text{Punto 5} - I \cdot \text{Cabina de seguridad biológica} + J \cdot \text{Punto 6}$$

$$\text{Punto 12 (Area de Inducción de IFN)} = K + L \cdot \text{Punto 8} - M \cdot \text{Punto 9} + N \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} - O \cdot \text{Punto 11} - P \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2} + Q \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 3} + R \cdot \text{Punto 10}$$

$$\text{Punto 15 (Area de Purificación)} = S + T \cdot \text{Punto 16} - U \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} - V \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2} + W \cdot \text{Punto 14} + X \cdot \text{Punto 13} - Y \cdot \text{Punto 17} + Z \cdot \text{Punto 18}$$

Ecuaciones 1

$$\text{Punto 2 (Area de Virología)} = A1 - C1 \cdot \text{Punto 3} + D1 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1}$$

$$\text{Punto 7 (Area Preparación de disoluciones)} = F1 + J1 \cdot \text{Punto 6}$$

$$\text{Punto 12 (Area de Inducción de IFN)} = K1 + L1 \cdot \text{Punto 8} - O1 \cdot \text{Punto 11} + N1 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} + Q1 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 3.}$$

$$\text{Punto 15 (Area de Purificación)} = S1 + W1 \cdot \text{Punto 14} - V1 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2} + T1 \cdot \text{Punto 16}$$

Ecuaciones 2

mano e inducidas a producir IFN utilizando virus Sendai. El IFN es secretado al medio, separado de los leucocitos que lo produjeron por centrifugación y posteriormente purificado en dos etapas en las que se realizan pasos sucesivos de precipitación.⁷

Todo el proceso de producción transcurre en cabinas de seguridad biológica, clase 100, para las cuales se establece como límite de acción 1 UFC/placa por hora y de acuerdo con la clasificación establecida por la USP 23.⁸ Igualmente,

se regula que las áreas donde se encuentren dichas cabinas cumplan los requisitos establecidos para la clase 1000.

Teniendo en cuenta estos factores, el análisis de los datos históricos evidenció que no existe el mismo comportamiento en cuanto a los niveles microbiológicos en todos los locales. Los valores más estables e inferiores de los conteos se obtuvieron en las áreas de purificación, siendo precisamente estas las de mayor exigencia en cuanto a la apli-

cación de los programas de higiene, desinfección y de control ambiental por corresponderse con las etapas finales del proceso.

La Tabla 1 muestra los puntos analizados por cada área, así como los límites de alerta y acción obtenidos a partir del análisis de los datos históricos procedentes del Programa de control ambiental. Para ello, se tuvo en cuenta una base de datos que abarca un período de tres años, en los cuales fue realizado el control ambiental mediante la técnica de placa

Tabla 1. Agrupación en clases de los datos, para cada punto, determinación de la frecuencia acumulada y su porcentaje.

Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)	Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)	
1	0	34	34	2	0	54	54	
	1	27	61		3	27	81	44,0
	3	15	76		2	20	101	54,8
	8	11	87		1	20	121	65,7
	5	11	98		8	11	132	71,7
	2	11	109		5	10	142	77,1
	4	10	119		15	8	150	81,5
	10	8	127		10	7	157	85,3
	20	5	132		7	5	162	88,0
	7	4	136		6	5	167	90,7
	6	4	140		4	5	172	93,4
	30	3	143		11	3	175	95,1
	35	2	145		18	2	177	96,2
	25	2	147		16	2	179	97,2
	15	2	149		9	2	181	98,3
12	2	151	97,42	20	1	182	98,9	
300	1	152	98,06	14	1	183	99,4	
18	1	153	98,71	12	1	184	100,0	
17	1	154	99,35					
13	1	155	100,00					
3	0	69	69	4	10	20	26	
	1	40	109		0	17	43	19,2
	2	18	127		8	12	55	25,5
	3	11	138		18	12	67	31,7
	5	7	145		7	10	77	36,9
	4	4	149		4	10	87	42,1
	10	3	152		15	9	96	46,8
	8	2	154		3	8	104	51,0
300	1	155	100,00	11	8	112	55,2	
5	1	47	47	16	7	119	58,8	
	0	36	83	5	6	125	61,9	
	2	26	109	2	6	131	65,1	
	3	20	129	9	5	136	67,7	
	5	12	141	6	5	141	70,3	
	6	8	149	73,01	20	5	146	72,9
	4	8	157	82,20	13	5	151	75,5

Continúa en las cuatro páginas siguientes.

Tabla 1 (Continuación).

Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)	Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)
5	10	6	163	4	12	5	156
	9	5	168		35	4	160
	7	4	172		25	4	164
	8	3	175		22	4	168
	14	3	178		14	4	172
	16	2	180		1	4	176
	11	2	182		30	3	179
	300	1	183		36	2	181
	35	1	184		26	2	183
	29	1	185		19	2	184
	25	1	186		100	1	185
	24	1	187		300	1	186
	22	1	188		50	1	187
	19	1	189		44	1	188
	15	1	190		40	1	189
	12	1	191		34	1	190
6	10	16	16	7	0	46	46
	16	12	28		1	35	81
	7	12	40		2	25	106
	9	11	51		5	14	120
	0	11	62		3	13	133
	11	10	72		6	11	144
	8	9	81		8	10	154
	4	9	90		7	9	163
	2	9	99		10	8	171
	14	8	107		9	8	179
	5	8	115		4	4	183
	18	7	122		12	2	185
	12	7	129		17	1	186
	6	7	136		16	1	187
	3	7	143		8	5	32
	15	6	149		3	25	57
25	5	154	2	25	82		
30	4	158	4	19	101		
20	4	162	6	17	118		
1	4	166	0	13	131		
35	3	169	7	12	143		
32	3	172	10	11	154		
21	2	174	1	11	165		
19	2	176	8	8	173		
13	2	178	9	5	178		
300	1	179	300	2	180		
50	1	180	19	2	182		

Tabla1 (Continuación).

Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)	Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)
6	40	1	181	8	13	2	184
	31	1	182		12	2	186
	29	1	183		35	1	187
	28	1	184		29	1	188
	27	1	185		28	1	189
	26	1	186		25	1	190
	24	1	187		23	1	190
	22	1	188		15	1	192
9	0	60	60	10	4	25	25
	1	57	117		5	18	43
	3	12	129		7	17	60
	4	11	140		10	14	74
	5	10	150		8	13	87
	2	9	159		2	13	100
	11	2	161		6	11	111
	10	2	163		3	11	122
	7	2	165		0	11	133
	6	2	167		9	10	143
	300	1	168		12	7	150
	69	1	169		1	7	157
	20	1	170		11	6	163
	13	1	171		15	3	166
	9	1	172		30	2	168
					24	2	170
					20	2	172
			18	2	174		
			16	2	176		
			14	2	178		
			300	1	179		
			39	1	180		
			32	1	181		
			19	1	182		
			13	1	183		
					100,0		
11	0	41	41	12	0	36	36
	1	40	81		1	32	68
	2	38	119		2	30	98
	3	22	141		3	28	126
	4	16	157		5	19	145
	5	10	167		4	8	153
	7	6	173		6	7	160
	6	5	178		10	6	166
	8	4	182		8	6	172
	10	3	185		7	4	176
	9	3	188		13	3	179
	300	1	189		9	3	182
	26	1	190		20	2	184
	20	1	191		18	2	186
	18	1	192		35	2	188
13	1	193	11	1	189		
12	1	194	31	1	190		
					96,4		

Tabla 1 (Continuación).

Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)	Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)							
11	11	1	195	100,00	12	30	191	96,9						
						22	192	97,4						
						17	193	97,9						
						16	194	98,4						
						15	195	98,9						
						14	196	99,4						
						12	197	100,0						
13	10	29	29	15,34	14	1	30	15,3						
						5	29	30,2						
						3	27	44,1						
						0	24	56,4						
						2	20	66,6						
						8	17	75,3						
						4	16	83,5						
						7	12	89,7						
						6	7	93,3						
						9	3	94,8						
						10	3	96,4						
						11	2	97,4						
						13	1	97,9						
						26	1	98,4						
						25	1	98,9						
						15	1	99,4						
						12	1	99,4						
						3	4	100,0						
						15	3	4	165	87,30	15	0	76	39,1
												1	41	60,3
												2	28	74,7
												3	21	85,5
												7	7	89,1
4	6	92,2												
5	5	94,8												
10	3	96,3												
6	3	97,9												
21	1	98,4												
11	1	98,9												
9	1	99,4												
8	1	99,4												
16	6	22	22	11,22	17							0	60	31,0
						1	54	59,0						
						7	42	80,8						
						2	13	87,5						
						3	9	92,2						
						4	5	94,8						
						8	3	96,3						
						300	2	97,4						
						12	2	98,4						
						15	1	98,9						

Tabla 1 (Continuación).

Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)	Punto	Clases (UFC)	Frecuencia	Frecuencia acumulada (%)		
16	20	7	157	17	9	1	192		
			80,10					99,4	
	16	6	163			10	1	193	
			83,16					100,0	
	13	5	168		18	0	86	86	
			85,75						44,1
	15	4	172				1	40	126
			87,76						64,6
	14	4	176				7	24	150
			89,80						76,9
11	4	180		2		19	169		
		91,84					86,6		
9	3	183		3		11	180		
		93,37					92,3		
300	2	185	94,39		8	4	184		
							94,3		
	18	2	187	95,41		6	187		
							95,9		
	17	2	189	96,43		5	189		
							96,9		
	12	2	191	97,45		4	191		
							97,9		
	22	1	192	97,96		15	192		
							98,4		
35	1	193	98,47		30	1	193		
							98,9		
	31	1	194	98,98		12	194		
							99,4		
	100	1	195	99,49		10	195		
							100,0		
	21	1	196	100,00					

expuesta. A partir de estos datos, los conteos de UFC se dividieron en clases y se calculó la frecuencia acumulada de estas clases y su porcentaje.

Al determinar los límites de alerta y de acción como el 68 y el 95 % de la frecuencia acumulada respectivamente (Tabla 2), para cada uno de los puntos de muestreo, prácticamente en todos los casos se establecieron límites de acción inferiores a 25 UFC/placa por hora, con lo cual se demostró que dichos locales cumplen con los requerimientos establecidos para las áreas clase 1000.⁸ Las áreas de trabajo con mayor límite de acción se correspondieron con algunos puntos dentro de los locales de Inducción de IFN y de Preparación de disoluciones. Este resultado es consistente con el hecho de que en estas áreas se desarrollan los primeros pasos del proceso de producción y se manipula un gran volumen de material biológico procedente de los bancos de sangre del país (concentrados leucocitarios y sueros humanos), y este régimen de trabajo influye en la contaminación microbiana del ambiente, a pesar de que todas las bolsas son tratadas con etanol 70% antes de ser introducidas al flujo productivo. Es evidente que la cantidad de microorganismos en las diferentes áreas se encuentra en estrecha vinculación con el proceso, por lo que se obtienen las mayores cantidades en los pasos iniciales.

Con el objetivo de identificar los puntos de muestreo que influyen de forma más significativa en el conteo

Tabla 2. Límites de alerta y acción de los diferentes locales de cada área, establecidos de acuerdo con las frecuencias acumuladas determinadas a partir de los conteos microbiológicos históricos.

Area	Local	Límite	
		De alerta	De acción
(UFC/placa por hora)			
Virología	Punto 1	5	25
	Punto 2	1	11
	Punto 3	1	5
Preparación de Disoluciones	Punto 4	9	44
	Punto 5	3	11
	Punto 6	6	13
	Punto 7	5	9
Inducción de Interferón Alfa Humano Leucocitario	Punto 8	0	13
	Punto 9	1	10
	Punto 10	3	18
	Punto 11	2	10
	Punto 12	3	35
	Punto 13	4	13
Purificación	Punto 14	2	9
	Punto 15	1	5
	Punto 16	8	18
	Punto 17	1	8
	Punto 18	1	6

microbiológico para cada área, se obtuvieron las ecuaciones lineales que relacionan a las diferentes variables por área, mediante el empleo del método de regresión múltiple y de los datos existentes del control ambiental. Se seleccionó en cada área el lo-

cal o punto en el que se obtiene en su forma final cada uno de los productos intermedios del proceso, que deben pasar a la próxima etapa y por tanto cumplir con mayores exigencias de limpieza, y se definieron estos puntos como las variables inde-

Tabla 3. Ecuaciones que describen el comportamiento de los diferentes puntos por área.

Area	Ecuaciones experimentales
Punto 2 (Area de Virología)	$= 3,374\ 0 + 0,012\ 3 \cdot \text{Punto 1} - 0,172\ 0 \cdot \text{Punto 3} + 0,682\ 9 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} + 0,002\ 9 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2}$
Punto 7 (Area Preparación de Disoluciones)	$= 2,661\ 1 + 0,021\ 1 \cdot \text{Punto 4} - 0,010\ 8 \cdot \text{Punto 5} - 0,008\ 3 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica} + 0,027\ 2 \cdot \text{Punto 6}$
Punto 12 (Area de Inducción de IFN)	$= 2,928\ 2 + 0,104\ 4 \cdot \text{Punto 8} - 0,008\ 0 \cdot \text{Punto 9} + 0,807\ 3 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} - 0,153\ 1 \cdot \text{Punto 11} - 0,030\ 9 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2} + 0,088\ 1 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 3} + 0,057\ 6 \cdot \text{Punto 10}$
Punto 15 (Area de Purificación)	$= 0,514\ 6 + 0,091\ 1 \cdot \text{Punto 16} - 0,127\ 8 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} - 0,092\ 9 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2} + 0,145\ 0 \cdot \text{Punto 14} + 0,037\ 1 \cdot \text{Punto 13} - 0,003\ 6 \cdot \text{Punto 17} + 0,010\ 1 \cdot \text{Punto 18}$

Tabla 4. Ecuaciones resultantes del análisis de regresión múltiple aplicado a los resultados de los controles microbiológicos de las áreas de producción de Interferón Alfa Humano Leucocitario.

Area	Ecuaciones finales
Punto 2 (Area de Virología)	$= 2,759\ 8 - 0,127\ 9 \cdot \text{Punto 3} + 0,683\ 7 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1}$
Punto 7 (Area Preparación de Disoluciones)	$= 1,128\ 6 + 0,155\ 3 \cdot \text{Punto 8}$
Punto 12 (Area de Inducción de IFN)	$= 2,636\ 4 + 0,103\ 9 \cdot \text{Punto 8} - 0,091\ 9 \cdot \text{Punto 11} + 0,232\ 3 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 1} + 0,006\ 7 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 3}$
Punto 15 (Area de Purificación)	$= 0,882\ 4 + 0,157\ 2 \cdot \text{Punto 14} - 0,003\ 0 \cdot \text{Cabina de seguridad biológica 2} + 0,003\ 0 \cdot \text{Punto 16}$

Tabla 5. Comparación entre los resultados obtenidos por diferentes métodos estadísticos, para los límites de alerta y acción determinados.

Area	Límites calculados			
	A partir de las frecuencias acumuladas		A partir de las ecuaciones propuestas (Tabla 3)	
	Alerta (68 %)	Acción (95 %)	Alerta	Acción
Punto 2 (Area de Virología)	1	11	0	10
Punto 7 (Area de preparación de Disoluciones)	3	9	1	7
Punto 12 (Area de Inducción)	3	35	2	34
Punto 15 (Area de Purificación)	1	5	1	5

pendientes de los modelos a estudiar. La tabla 3 muestra las primeras ecuaciones obtenidas experimentalmente.

En el análisis de varianza de las ecuaciones obtenidas en la regresión se determinaron aquellos lugares de muestreo cuyo comportamiento influyó significativamente ($p < 0,05$) en las variables seleccionadas y se calcularon los valores esperados para cada uno. Se determinaron aquellos que se desvían significativamente del modelo de regresión obtenido y finalmente, estos puntos y las variables no significativas fueron eliminados. Al aplicarse nuevamente la regresión múltiple utilizando como variables independientes los puntos de muestreo determinados como significativos en cada área, se obtuvo

para cada uno, una nueva ecuación lineal (Tabla 4) en la que los coeficientes de cada variable indican el grado de influencia de esta en el control microbiológico del punto seleccionado.

El ajuste correcto de los modelos de ecuaciones propuestos se corroboró por la coincidencia de los límites de alerta y acción establecidos utilizando los datos históricos (Tabla 5) con los obtenidos como resultado de la evaluación de estas ecuaciones, en cada punto seleccionado.

CONCLUSIONES

Se establecieron los límites de alerta y acción de todas las áreas del proceso de producción de Interferón Alfa Humano Leucocitario y Factor

de transferencia y se comprobó que cumplen con los requisitos establecidos para la obtención de inyectables con relación al comportamiento de los niveles de contaminación microbiológica.

El estudio demostró que los mayores límites de conteo microbiológico se encuentran en las áreas donde se realizan los pasos iniciales del proceso (Preparación de Disoluciones e Inducción), lo cual se corresponde con los mayores flujos de trabajo y manipulación de material biológico.

Se comprobó que ambos métodos son efectivos en la determinación de los límites de alerta y acción, además de la validez de las ecuaciones propuestas a partir de la comparación de los límites obtenidos teóricamente con los determinados tomando como base los datos históricos acumulados.

El sistema de ecuaciones propuesto permite identificar en cada área, las variables significativas dentro del flujo de producción y tomar acciones sobre los puntos y variables de interés, además de modificar los límites futuros de UFC con lo que se logra reducir los límites de alerta y acción para las condiciones actuales.

El método de regresión múltiple permite estructurar acciones correctivas concretas sobre las aplicaciones de desinfectantes y rotaciones en las distintas etapas de la activi-

dad productiva, tanto en tiempo como espacialmente e implica la modificación conveniente de un conjunto de Prácticas de Trabajo que redundan sobre el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Producción y sobre la evaluación del desempeño dentro de la instalación.

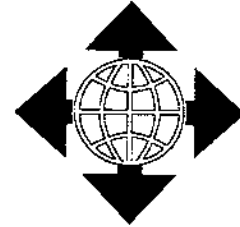
BIBLIOGRAFIA

1. Parenteral Drug Association. PDA environmental task force. Fundamentals of a microbiological environmental monitoring program. *Journal of Parenteral Science & Technology*, 44 (Supplement), 3, 1990.

2. Immel B. Environmental Monitoring and Other Facts of Life. *BioPharm*, 11, 48, 1998.
 3. PhRMA Biological and Biotechnology Committee White Paper Task Force. Environmental Control and Monitoring in Bulk Manufacturing Facilities for Biological Products. *Pharmaceutical Technology*, 22, 40, 1998.
 4. Wilson D.W. Setting Alert/Action Limits for Environmental Monitoring Programs. *Journal of Parenteral Science & Technology*, 51, 161, 1997.
 5. United State Pharmacopeia National Formulary (USP 23), 486, 1995.

6. Mho M.G., Hernández J.M. y Pérez T.O. La regresión múltiple como herramienta para la selección de puntos de muestreo en el control ambiental de áreas limpias. *Revista Brasileira de Farmacia*, 79, 10, 1998.
 7. Cantell K., Hirvonen S., Kauppinen H.L. and Myllylä G. Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. En: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 78, 29, 1981.
 8. Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments. *Microbiological Evaluation/General Information Eight Supplement, USP - NF (23)*, 4426, 1998.

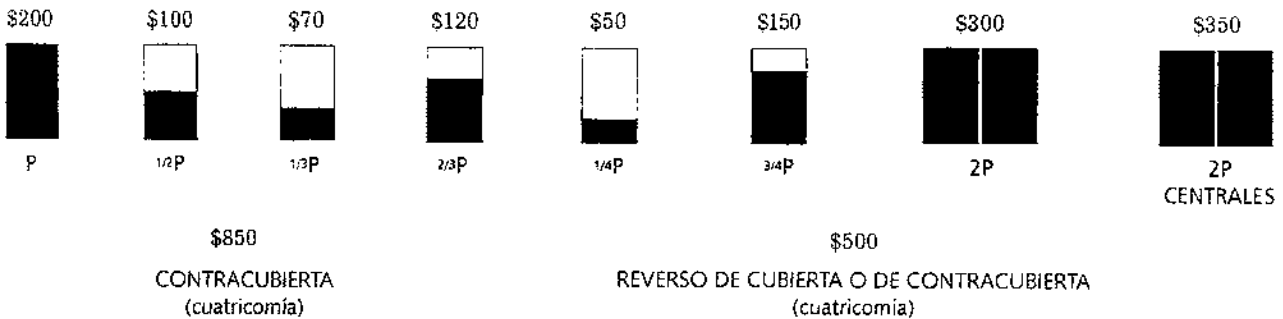
¿BUSCA PUBLICIDAD?



La Revista CENIC Ciencias Biológicas le puede ayudar eficazmente a difundir su mensaje, así como a viabilizar sus contactos y propiciar intercambios y relaciones futuras con la comunidad científica nacional e internacional y sus instituciones respectivas.

Aproveche esta oportunidad que a módicos precios le ofrece para que su mensaje viaje y llegue con ella, a su círculo especializado de lectores.

TARIFAS (USD)



La contratación por un año (tres números) de este servicio, le proporciona como beneficio adicional, un descuento del 15 %.

Dirija su solicitud a:

Editorial CENIC
 CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.