

## Validación del proceso de esterilización por calor seco, empleando como indicador biológico esporas de *Bacillus atrophaeus*

Roberto Koga\*, Carlos Novoa

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

### Resumen

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura y fabricación de productos parenterales, la norma exige la validación de los procesos de esterilización. El objetivo de este trabajo es validar el proceso de esterilización por vía seca en la estufa empleada para la esterilización de materiales que se utilizaron en la producción de radiofármacos y agentes para radiodiagnóstico, utilizando como indicador biológico cintas que contienen esporas de *Bacillus atrophaeus*. Para esta validación previamente la estufa fue calibrada. Los ensayos se realizaron con el equipo sin carga de trabajo y con la mayor cantidad de carga, teniendo como resultado que para ambos casos la esterilización fue la adecuada ya que después del proceso de esterilización no hubo crecimiento microbiano de los indicadores al ser inoculados en los medios de cultivos.

### Abstract

In order to fulfill good manufacturing practice for parenteral products, the Standard requires the validation of sterilization processes. The purpose of this work is to validate the processes of sterilization by dry heat in the stove used for sterilizing of materials used in the production of radiopharmaceuticals and agents for radiodiagnostic drugs, using strips containing spores of *Bacillus atrophaeus* as biological indicator. Thus, first, the sterilization oven was calibrated and then tests were performed without load and loading the equipment with the maximum permitted load. In both cases the sterilization processes were adequate, as no microbial growth of the biological indicators in tryptic soy broth was observed.

### 1. Introducción

Las cepas de la especie *Bacillus subtilis* var. niger tienen muchas aplicaciones, una de ellas es el empleo de este microorganismo esporulado para la validación del proceso de esterilización por calor seco [1]. A través de estudios moleculares se reclasificó a la especie *Bacillus subtilis* basado en la producción de sus pigmentos y estudios de hibridación de su ADN, pudiéndose diferenciar tres grupos de cepas. Grupo 3 no producía pigmento en ninguno de los medios de cultivo incluyendo al tipo de cepa *B. subtilis*. Grupo 2 formaba un tipo de pigmento variante, pero seguían perteneciendo a *Bacillus subtilis* sensu stricto de acuerdo con los estudios de su ADN y con gran similitud al ADN del grupo 3. Grupo 1 producía un pigmento de color marrón negro en uno de los medios y un pigmento marrón en otro medio de cultivo, y mostraba bajos niveles de ADN hibridados en comparación a los grupos 2 y 3, describiendo

de esta forma una nueva especie *Bacillus atrophaeus* [2]. Las buenas prácticas de manufactura en la fabricación de productos parenterales, exige validar los procesos de esterilización que se utiliza para esterilizar por calor húmedo o calor seco, asegurando de esta manera la idoneidad de los materiales que han de intervenir en la fabricación de los fármacos.

La acción letal del calor seco se debe fundamentalmente al proceso de oxidación de los componentes celulares. Debido a que el calor seco es menos eficaz que el calor húmedo, se requiere una temperatura y tiempo de exposición más altos [3]. Las estufas utilizadas para el proceso de esterilización se controlan por un termostato y estos equipos deben proporcionar la circulación uniforme del aire caliente dentro de la estufa.

En el presente trabajo se describe la

\* Correspondencia autor: rkoga@ipen.gob.pe

validación del proceso de esterilización por calor seco, previamente a esta validación la estufa fue calibrada conociendo de antemano los puntos más fríos en la estufa. Se empleó como indicador biológico esporas en tiras de *Bacillus atrophaeus* de  $5,4 \times 10^6$ /unit. sometido a  $250^\circ\text{C}$  por 5 horas [5], validando el proceso de esterilización por calor seco sin carga (equipo vacío) y con carga de trabajo.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Características físicas de la estufa

El estudio se realizó por el método de batch en la estufa marca SHELL LAB modelo 1350FX con recirculado de aire, que fue calibrado previo a las pruebas.

### 2.2 Indicador biológico

Se utilizó un kit SGM Strip, el cual contiene esporas de *Bacillus atrophaeus* contenidas en un filtro de papel que contiene una población de  $5,4 \times 10^6$ /unit. (Figura 1).

### 2.3 Prueba de esterilización por calor seco

Se coloca dentro de la estufa viales o tubos de ensayos que contienen las cintas con esporas de los indicadores biológicos (*Bacillus atrophaeus*), luego se tapan los envases con papel aluminio. Luego, se cierra la estufa y se programa el tiempo y temperatura para el proceso de esterilización, para nuestro caso es de  $250^\circ\text{C}$  por 5 horas. Para esta prueba se trabajó con el equipo sin carga (vacío) y con carga de trabajo, realizando cada ensayo por triplicado. Una vez terminado el proceso de esterilización los envases que contienen a los indicadores son trasladados al laboratorio de microbiología para el procesamiento de las muestras. Se destapan los envases que contiene a los indicadores dentro de una campana de bioseguridad, con la ayuda de una pinza estéril se retira las cintas que contiene las esporas de *Bacillus atrophaeus* y son sembradas en unos tubos de ensayos que contiene caldo tripticasa de soya a  $32,5^\circ\text{C} \pm 2,5$  y se va observando los tubos por un espacio de 7 días para ver si hay crecimiento microbiano o no; al mismo tiempo, se siembra una tira con el indicador que no halla sido sometida al proceso de esterilización,

sirviendo como un control positivo de la prueba.

## 3. Resultados

### 3.1 Estudio realizado sin carga de trabajo

Para este ensayo se utilizó 25 indicadores que estuvieron contenidos dentro de viales limpios transparentes rotulados y distribuidos dentro de la estufa (Figura 2), se cierra la estufa y se realiza el proceso de esterilización ( $250^\circ\text{C}$  por 5 horas) estas pruebas se hacen por triplicado. En ninguno de los indicadores utilizados para este ensayo hubo crecimiento microbiano durante los 7 días que duró el estudio (Tabla 1).

### 3.2 Estudio realizado con carga de trabajo

En este ensayo se utilizó como modelo la esterilización de viales utilizados en la producción de radiofármacos y agentes para radiodiagnóstico (Figura 4). Para este caso, dentro de la estufa se coloca una caja de acero inoxidable el cual contiene a los viales. Habiendo una mayor dificultad en la transferencia del calor hacia los materiales a esterilizar (peor caso). Dentro de la caja de acero inoxidable se distribuyó de manera homogénea los indicadores biológicos que estaban contenidas dentro de viales limpios y transparentes, al realizar los ensayos respectivos dio como resultado que en ninguno de los casos hubo crecimiento microbiano durante los 7 días que duro el estudio por cada prueba (Tabla 2).

## 4. Conclusiones

Después de haber finalizado con las pruebas del proceso de esterilización por calor seco, proceso que esta basado en la circulación de aire caliente en el interior de la estufa SHELL LAB modelo 1350FX, a una temperatura de  $250^\circ\text{C}$  por 5 horas, se pudo comprobar que el mecanismo de transferencia de calor es el adecuado hacia los materiales en la destrucción de los microorganismos. De esta manera se determina que el proceso de esterilización por vía seca queda validado, garantizándonos de esta manera que el equipo cumple con el parámetro adecuado de trabajo para el proceso de esterilización.

**Tabla 1.** Resultados de los ensayos de esterilización por calor seco sin carga de trabajo (equipo vacío).

	Medio cultivo	Temperatura (°C)	Crecimiento microbiano en días							
			1	2	3	4	5	6	7	
*Primer ensayo Control Positivo	Caldo TCS	32,5 ± 2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
*Segundo ensayo Control Positivo	Caldo TCS	32,5 ± 2,5	+	+	+	+	+	+	+	+
*Tercer ensayo Control Positivo	Caldo TCS	32,5 ± 2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
			+	+	+	+	+	+	+	+

\* Cada ensayo se utilizó 25 indicadores  
 Medio CTS: Caldo Triptocasa de Soya.  
 +: Crecimiento microbiano.  
 -: Sin crecimiento microbiano

**Tabla 2.** Resultados de los ensayos de esterilización por calor seco con mayor carga de trabajo.

	Medio cultivo	Temperatura (°C)	Crecimiento microbiano en días							
			1	2	3	4	5	6	7	
*Primer ensayo Control Positivo	Caldo TCS	32,5 ± 2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
*Segundo ensayo Control Positivo	Caldo TCS	32,5 ± 2,5	+	+	+	+	+	+	+	+
*Tercer ensayo Control Positivo	Caldo TCS	32,5 ± 2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
			+	+	+	+	+	+	+	+

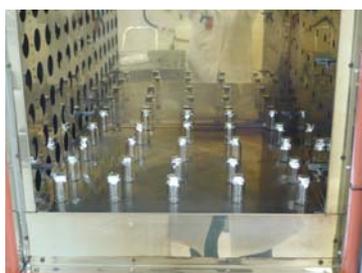
\* Cada ensayo se utilizó 25 indicadores  
 Medio CTS: Caldo Triptocasa de Soya.  
 +: Crecimiento microbiano.  
 -: Sin crecimiento microbiano



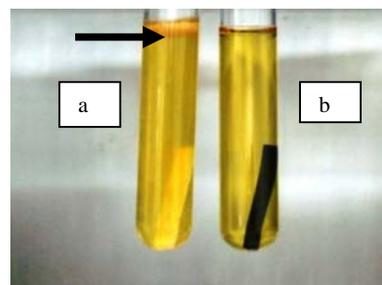
**Figura 1.** Indicador biológico, cinta que contiene a las esporas del *Bacillus atrophaeus*.



**Figura 4.** Disposición de la bandeja dentro de la caja de acero inoxidable para su esterilización.



**Figura 2.** Disposición de los indicadores biológicos dentro de la estufa sin carga de trabajo.



**Figura 5.** Indicadores biológicos que fueron sometidos al proceso de esterilización e incubados en caldo tripticasa de soya por 7 días, no se observa crecimiento microbiano: **a)** Con crecimiento microbiano. **b)** Sin crecimiento microbiano.

## 5. Bibliografía

- [1] USP-30-NF 25. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario nacional. 2da. Edición. Esterilización por calor seco. (2007) 1:738.
- [2] Fritze D, Pukall R. Reclassification of bioindicator strains bacillus subtilis DMS 675 and Bacillus subtilis DMS 2277 as Bacillus atrophaeus. International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology. 2001; 51:35-37.
- [3] Iturralde J P. Fabricación de productos estériles (y II). Esterilización y esterilidad. Industria Farmacéutica. 1999 marzo/abril. p. 59-69.
- [4] García J, García V. Técnicas de descontaminación: Limpieza desinfección esterilización. 1ra. ed. Madrid: Editorial Paraninfo; 2003.
- [5] Perdomo R, Montero V. Validación de un ciclo de despirogenización por calor seco con el empleo del ensayo del lisado de amebocitos de limulus. Rev. Cubana Farm. 2003;37(3). Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol37\\_3\\_03/far01303.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol37_3_03/far01303.htm)
- [6] Gilis J. Development of biological indicator for ClorDiSys Solutions, Inc. Chlorine Dioxide Sterilizer. SGM Biotech, INC Report 031206R. October 28, 2004.