

WFI y esterilidad. 2ª Parte. Sistemas de distribución

En la primera parte de esta serie revisamos el concepto de esterilidad, así como las diferentes alternativas para la generación de WFI y sus implicaciones. En esta segunda parte, de nuevo desde el punto de vista de la esterilidad, revisaremos las diferentes alternativas disponibles para acometer un sistema de distribución.

La primera parte de este artículo se publicó en el anterior número 128 de la revista. Página 56

SANTIAGO FERNÁNDEZ VENTURA
BWT PHARMA & BIOTECH IBERICA S.A.

Microorganismos en sistemas de distribución

El agua para inyectables es un líquido que responde a unas características definidas de pureza que ya vimos en la primera parte. Además de los límites químicos y orgánicos que se regulan en las farmacopeas se nos impone la limitación de no añadir sustancia alguna al líquido.

Esta última es una petición compleja: el agua además de un excelente disolvente es el medio preferido para muchos microorganismos, ya que encuentran en ella condiciones óptimas de temperatura y nutrientes, de modo que en ausencia de acciones que limiten su establecimiento y crecimiento, tendremos sin duda poblaciones elevadas.

Para otros usos industriales del agua, incluidos agua potable, agua para otros procesos y usos de refrigeración, habitualmente podremos adicionar algún tipo de biocida con efecto residual en los sistemas de distribución. Esto permite mantener bajas las poblaciones de microorganismos, o cuando menos, limitar el riesgo de proliferación. Aun y así, no es inhabitual que se den casos de alarma ambientales relacionados con la *Legionella Pheumophila*, bacterias coliformes u otros microorganismos objetables.

El común denominador de esos microorganismos es que son gram negativos, y que

- Forman biofilm
- Al eliminarlos generan endotoxinas

Biofilm

El biofilm es un agregado de microorganismos en el que todas las células están adheridas entre sí y que está normalmente anclado a una superficie que puede ser de casi cualquier material y rugosidad.

Las células presentes en el biofilm suelen estar incrustadas en una matriz de polisacáridos,

conocida como EPS, que contiene azúcares y ADN, y que atrapa una enorme variedad de compuestos beneficiosos para el crecimiento bacteriano. En una etapa inicial, el biofilm se adhiere de forma débil a la superficie y en fases posteriores los microorganismos presentes en el biofilm comienzan a sintetizar una serie de estructuras que le ayudan a adherirse a la superficie y a otras bacterias, formando una colonia estable.

Tras la formación de la colonia, el biofilm inicia la producción de polisacáridos y forma el EPS. A partir de ese momento los microorganismos de la capa más exterior del EPS pueden aprovechar el mecanismo de dispersión que le ofrece el medio y abandonar la biopelícula y colonizar los entornos vecinos.

En la mayoría de los sistemas de distribución de agua (incluidos los farmacéuticos) existen poblaciones de microorganismos en forma de biofilm adheridas a las superficies de los equipos. Pueden encontrarse en prácticamente cualquier superficie del entorno en la que haya suficiente humedad.

En consecuencia, es probable que los microorganismos no estén distribuidos uniformemente por todo el sistema, y por ello, una muestra tomada en un momento o punto dado puede no ser representativa del verdadero nivel de contaminación en el sistema.

La matriz EPS es altamente resistente tanto a la sanitización térmica como a la sanitización química. La eliminación incompleta de la biopelícula causará la vuelta de ésta al estado de equilibrio previo, o la hará desarrollar capacidades de resistencia ampliadas. Para eliminar o destruir totalmente la biopelícula se utilizan tratamientos químicos y físicos.

Los tratamientos físicos incluyen la circulación de agua caliente, depuradores o rascadores mecánicos y pulverizadores de alta presión.

Los biocidas químicos que pueden utilizarse son el ozono, el cloro, el dióxido de cloro, el

peróxido de hidrógeno, el ácido peracético y el hidróxido de sodio. Como ya hemos dicho, en determinados tipos de distribución (incluida el agua potable) es posible mantener un residual de biocida hasta el punto de uso, sin embargo, en sistemas farmacéuticos todo lo que se añade al sistema debe retirarse posteriormente para que en ningún caso llegue al punto de uso.

En realidad, y debido a que todos los biocidas químicos excepto el ozono (a) producen subproductos, en un sistema farmacéutico solo nos será posible actuar contra el biofilm evitando el crecimiento (limitando los nutrientes y/o aplicando regularmente ozono o agua a más de 70°C), pero una vez el biofilm ya se ha establecido, solo es eficazmente eliminado esterilizando a más de 121°C. El uso de otros medios químicos y mecánicos implicará el paro del sistema y un proceso complejo para su limpieza y vuelta a la operación(b).

1. Como veremos más tarde en realidad el ozono también puede producir subproductos, en particular oxígeno y CO₂.
- Al igual que el ozono el peróxido de hidrógeno puede ser eficazmente eliminado (liberando algo de oxígeno) con un ultravioleta, pero debido a su baja estabilidad suele utilizarse combinado con otras sustancias que lo estabilizan (como el ácido peracético o metales pesados), o corrigiendo el pH. En ambos casos se generan subproductos difíciles de eliminar.

Endotoxinas

Las endotoxinas son fundamentalmente lipopolisacáridos (LPS) que se derivan de las membranas celulares de las bacterias Gram negativas que las liberan continuamente en el medio, en pequeñas cantidades cuando están en crecimiento activo, y en grandes cantidades cuando mueren. La endotoxina tiene una pequeña parte lipídica que ancla el LPS a la membrana bacteriana y es responsable de sus efectos patógenos.

Las endotoxinas son moléculas muy estables capaces de resistir temperaturas y valores de pH extremos, por lo que no se inactivan eficazmente con los procedimientos habituales de esterilización por calor con tratamiento térmico a 121°C. El único proceso conocido para destruir eficientemente las endotoxinas implica la exposición de éstas a una temperatura de 250°C durante más de 30 min.

Por ello, la mejor manera de evitar las endotoxinas es evitar las bacterias en el agua y, si es posible, rechazar o retener las que puedan permanecer en ella. En sistemas de distribución nuestra mejor opción es minimizar la aparición del biofilm dentro del sistema lo que a su vez evitará la liberación de endotoxinas adicionales.

Al igual que en los sistemas de generación, tenemos la opción de retenerlas, por lo que el uso de filtros terminales (o en línea) es una opción, pero como veremos más abajo esta puede ser una opción controvertida.

Alternativas para la distribución

El objetivo de un sistema de distribución es ajustar el sistema a la demanda, manteniendo un tamaño de generación razonable y entregando el caudal necesario en los puntos de uso a la presión y temperatura deseados. Asimismo, no debe degradar la calidad de la WFI ni química ni microbiológicamente.

Tabla 1

Documento	Temperatura recomendada
USP40-NF35 Section 5.3.1 Thermal Sanitization	≥ 65°C
EMA Q&A on WFI document (1)	≥ 75°C
ISPE Baseline Guide for Water and Steam System (2019)	≥ 70°C
ISPE Cold WFI Handbook (2)	≥ 75°C
FDA: Guide to Inspections of High Purity Water Systems (1993); Section I. System Design	= 65–80°C
EMA: EudraLex; Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products; Equipment (paragraph 35)	≥ 70°C

Al igual que en el artículo previo no vamos a realizar aquí consideraciones de diseño, tan solo valoraremos las alternativas disponibles desde el punto de vista de la esterilidad, asumiendo un correcto diseño y dimensionamiento del anillo y su acumulación.

Las alternativas disponibles son básicamente dos

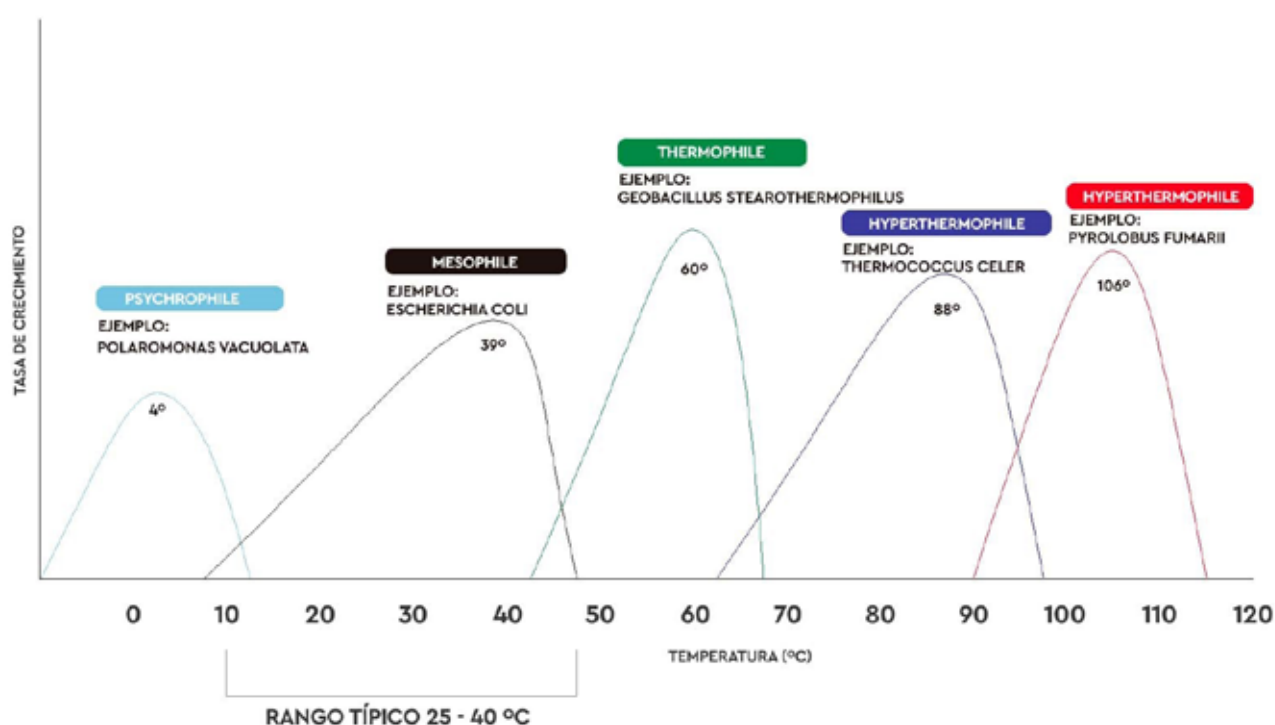
- Distribución en caliente a temperaturas superiores a 70°C
- Distribución en frío, a temperatura ambiente o más baja, con desinfección en continuo del tanque y desinfecciones puntuales del sistema (ozono o agua caliente)

Todas ellas se pueden combinar con esterilizaciones puntuales.

Distribución en caliente

La distribución en caliente se considera el “gold standard” para los sistemas de WFI y ciertamente es la que ofrece mayores garantías desde un punto de vista microbiológico.

En la primera parte ya vimos en detalle cómo actúa el agua caliente como desinfectante en la generación. Aquí nuestro objetivo será evitar el establecimiento y crecimiento de microorganismos y para ello buscaremos una temperatura que nos garantice la ausencia de bacterias. Dado que la mayor parte de las bacterias que encontramos en el agua son mesófilas tiene sentido calentar el agua por encima de los 50°C. Esa temperatura será muy efectiva para inactivar las bacterias planctónicas (suspendidas en el agua) pero muy poco eficaz con las que estén en forma bentónica (biofilm).



Sin embargo, si se aplica la temperatura de forma continuada si se puede garantizar la ausencia de bacterias (y por tanto limitar la aparición de biofilm), especialmente de aquellas que son susceptibles de cultivo en placa, que es como las vamos a medir.

Las temperaturas recomendadas varían según el autor o la guía (ver tabla 1), pero en general se acepta la convención de efectuar la distribución a 80°C ya que esto asegura un buen margen de seguridad respecto de la temperatura de inactivación, así como una operación a presión atmosférica.

Esterilización

El uso de agua caliente o vapor a 121°C se corresponde aproximadamente con una presión de 1 bar, pero también con 250°F, que es de donde viene esa convención. Cualquier temperatura por encima de 100°C nos permitiría esterilizar, pero para conseguir una correcta esterilización con tiempos de exposición relativamente cortos es adecuado aplicar el agua caliente o el vapor en el sistema a presiones de 1 bar o más. (Ver consideraciones respecto de esterilización y esterilidad en primera parte de esta serie)

Un apunte de diseño: al concebir un sistema de distribución esterilizable, además de considerar el tanque como un recipiente a presión, hay que tener en cuenta que determinados equipos o instrumentos pueden no ser compatibles con las temperaturas o presiones necesarias para la esterilización, por lo que habrá que protegerlos adecuadamente.

Distribución en frío

El uso cada vez más habitual de la WFI en frío en los puntos de uso y el incremento de los costes de la energía han hecho que paulatinamente todas las farmacopeas hayan aceptado el uso de WFI en frío. Hoy por hoy la china es la única farmacopea relevante que no permite su uso y todo indica que esa limitación desaparecerá en la próxima edición.

El uso de WFI en frío plantea retos importantes ya que en el mejor de los casos dejará un parte importante del sistema sin ningún tipo de protección ante una colonización de microorganismos. En el caso de que eso ocurra y se llegue a establecer un biofilm, ni el agua caliente a 80°C ni el ozono son eficaces para su remoción, por lo que es necesario disponer de una pauta de desinfección periódica adecuada del sistema, o mejor, disponer de la opción de esterilizar el sistema a demanda.

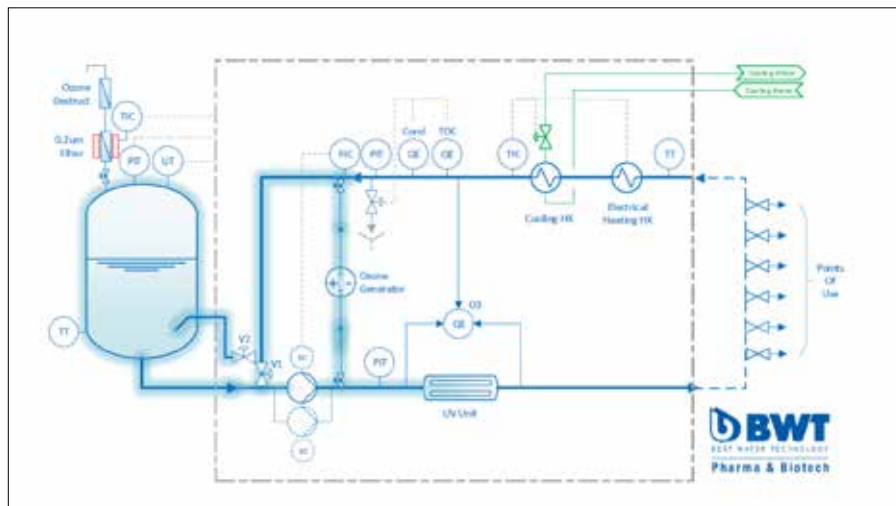


Fig 1: Ozonización del tanque en continuo (Cortesía de Patrick Archer)

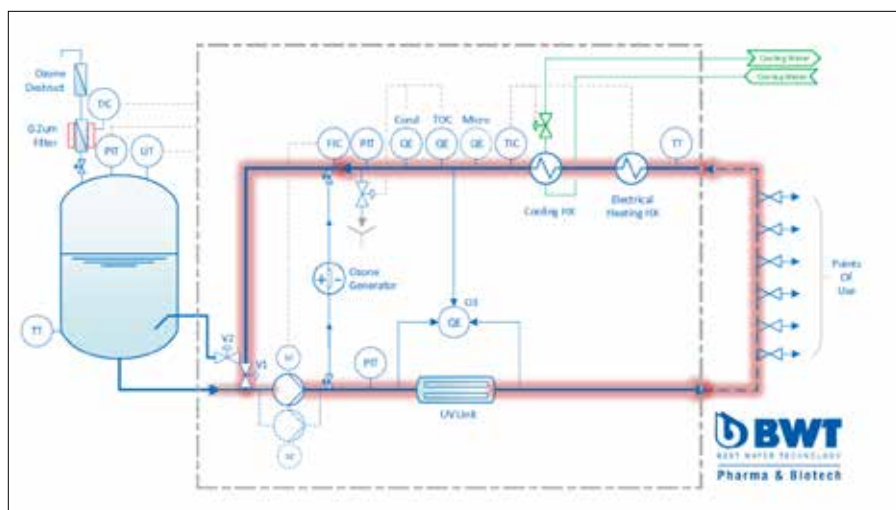


Fig 2: Esterilización sólo del anillo a petición (Cortesía de Patrick Archer)

En todo caso es muy poco recomendable operar un sistema en frío sin dotar al tanque de una protección microbiológica adecuada. Los volúmenes de acumulación en los sistemas de clean utilities habitualmente responden a necesidades productivas y su renovación puede tardar entre 4 y 12 horas, lo que de facto convierte a los tanques en enormes tramos muertos donde el agua está estancada por largos periodos.

Para proteger el depósito podemos bien mantenerlo en caliente y enfriar a la salida o bien ozonizarlo. La primera opción es muy poco habitual por razones de coste energético, por lo que el ozono suele ser la opción elegida para sistemas de WFI en frío.

Si optamos por ozono es posible combinarlo de forma eficiente con la esterilización. Por ejemplo, es posible ozonizar en continuo el tanque (Fig 1) con sanitizaciones puntuales por ozono de todo el sistema y esterilizaciones puntuales solo en el anillo (Fig 2), lo que permite realizar estas últimas de forma mucho más habitual al reducirse significativamente el tiempo de operación para una esterilización.

Consideraciones sobre el Ozono

El ozono como sustancia añadida

Como ya hemos dicho, las farmacopeas, en particular la USP, no permiten la adición de sustancias en las aguas compendiales. Si embargo las mismas farmacopeas (inclusive la misma USP en la monografía <1231>) si sugieren e incluso aconsejan el uso del ozono en sistemas de distribución.

Por ello, y con independencia de cómo se haya generado ese ozono, es imprescindible asegurar que es destruido y no llega en ningún caso a los puntos de uso. Los ultravioletas son extremadamente eficientes en la tarea de la destrucción de ozono, siendo el principal reto la medición de esa ausencia, ya que bajos niveles de ozono pueden ser un reto para los límites de detección de los equipos de medida.

Subproductos

Dependiendo de la forma en que se haya generado el ozono (electrolítico o corona) es posible que aparezcan niveles elevados de oxígeno y/o dióxido de carbono.

El oxígeno aparecerá con independencia del método utilizado. El riesgo de oxígeno elevado debe evaluarse, ya que podría suponer un riesgo potencial para el proceso o el producto, por su poder oxidante.

Más habitual en los sistemas que usan aire como base para la generación de ozono es la presencia de dióxido de carbono. Este puede causar un aumento de la conductividad. De hecho, el dióxido de carbono es un problema habitual en los sistemas en frío porque su solubilidad aumenta a temperaturas más bajas y algunos cambios críticos en la calidad del agua podrían pasarse por alto debido a su presencia. Es conveniente eliminarlo en los puntos de entrada (venteos de tanques o alimentación de generadores de ozono)

El ozono como biocida en la UE

El ozono es un biocida generado in situ. Los biocidas están regulados por el Reglamento 528/2012 de la UE. La autorización de biocidas dentro de este reglamento requiere en un primer paso la aprobación de la sustancia activa

y luego, en un segundo paso, la autorización de los biocidas que cubren la formulación completa o de los equipos que los generan (caso del ozono) para los diferentes usos individuales del producto.

Estas autorizaciones las obtienen los fabricantes que figuran en la lista del artículo 95 de la ECHA y que, por tanto, han obtenido la denominada “Carta de Acceso” (LoA), que les permite vender y utilizar el biocida o el equipo que lo genera en la UE. Todas las LoA figuran en el sitio web de la ECHA (<https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/active-substance-suppliers>).

La fecha de aprobación del ozono en la UE/EEE será el 1 de julio de 2024. La fecha de aprobación es importante porque los fabricantes de equipos de generación de ozono deberán presentar su expediente para solicitar la autorización de producto para el ozono antes ese día. A partir de esa fecha, sólo se podrá utilizar legalmente el ozono generado por dispositivos de aquellos fabricantes que sean miembros de un consorcio o asociación incluidos

en el artículo 95 de la ECHA y que hayan presentado un expediente de producto y recibido la correspondiente aprobación.

Para más información sobre el ozono ver mi artículo Ozono: la solución óptima para sistemas PW publicado en Pharmatec en noviembre del 2018.

Filtros

Como ya vimos en la primera parte de este artículo, históricamente la filtración no ha gozado del favor del regulador cuando se trata de garantizar la esterilidad en aguas compendiales. Pero no es menos cierto que ni la FDA ni otros organismos han prohibido nunca su uso para ese fin.

La USP en el capítulo <1231> (sección 5.1.9.) aborda el uso de filtros para la retención microbiológica en aguas compendiales e incluye varias advertencias respecto a su uso en agua debido a potenciales fugas. En el mismo punto indica que pueden utilizarse aguas abajo de las operaciones de equipos que tienden a liberar microorganismos o aguas arriba de las operaciones de la unidad que son sensibles a los microorganismos. Sin embargo, señala

CUMPLIMOS. SIEMPRE.

Envíos a temperatura controlada 2 °C – 8 °C
y 15 °C – 25 °C en España, Portugal y Andorra.



que un filtro en el punto de uso sólo debe servir para “pulir” la calidad microbiana de un sistema que, por lo demás, está bien mantenido, y no para servir como dispositivo principal de control microbiológico.

A pesar de que el uso de filtros para la generación de WFI a partir de PW es una alternativa incluida en la guía ISPE para WFI en frío², el uso de filtros como garantía de calidad microbiológica en puntos de uso, o como filtro en línea para “convertir” agua PW en WFI no está universalmente aceptado.

En una planta en Japón la empresa había puesto filtros estériles en los puntos de uso afirmando que después de ellos tenían WFI. Pero en la inspección realizada por la autoridad japonesa los inspectores no estuvieron de acuerdo y de hecho así se establece en la guía para la fabricación de medicamentos estériles desarrollada con el apoyo del ministerio de salud de ese país³.

Hay que tener en cuenta que los filtros de retención microbiana de 0,2 micras no retienen las bacterias en los sistemas de agua para siempre. Los filtros tienen una “vida retentiva” finita antes de que las bacterias los atraviesen, y puede ser diferente en los distintos sistemas de agua y en las distintas partes del sistema de agua, según el nivel y las especies que haya. Si se utilizaran filtros como única barrera y se produjera un fallo, el agua se volvería a contaminar con todo el volumen de organismos acumulados ya que estos tienden a acumularse en la superficie del filtro. Dado que en ambientes oligotróficos como el WFI las bacterias se alimentan en gran medida de ellas mismas, los filtros les crean un lugar óptimo para sobrevivir y su crecimiento se acelera.

Por lo tanto, si se utilizan filtros, los organismos reguladores esperan que se justifique correctamente su uso, que se valide la vida útil de los filtros antes de que dejen de retener las bacterias, y finalmente, que se asegure que los filtros se cambiarán antes de que exista riesgo de que las bacterias pasen, lo que implica como mínimo, pruebas de integridad regulares y el mencionado cambio programado.

Turbulencia

En general la mayor parte de los estudios disponibles coinciden en observar el mismo fenómeno: flujos altamente turbulentos además de proporcionar condiciones de absorción de nutrientes mejoradas, mejoran el crecimiento celular y la precipitación de compuestos que contribuyen al biofouling. También se verifica que altas velocidades de fluido generan una

mayor resistencia al desprendimiento del biofilm y que a las velocidades máximas de operación de un anillo las fuerzas de cizalladura generadas son sensiblemente inferiores a las necesarias para desprender el biofilm.

El enfoque clásico para velocidades de recirculación en anillos favorece Reynolds elevados, o, de forma más simple, establece velocidades mínimas en torno a 1,0 o 1.5 m/s. Sin embargo, esta configuración no solo no está refrendada por las diferentes farmacopeas, organismos reguladores o la ISPE, sino que además se muestra contraproducente generando estructuras de biofilm más estables, más resistentes y mejor adheridas.

Una buena gestión del biofilm en el anillo pasa por definir velocidades relativamente bajas, que no provoquen esas intensas adhesiones y que deben ser combinadas con un diseño y fabricación correcta de los anillos y con sanitizaciones continuas o regulares por temperatura u ozono.

De acuerdo con los estudios y en conformidad con las recomendaciones de las farmacopeas y la ISPE el uso de Reynolds en torno a 20.000 resulta adecuado para conseguir un balance óptimo entre remoción y limitación de la adhesión del biofilm, al tiempo que permite un ahorro energético significativo.

Una alternativa interesante es utilizar velocidades variables durante los periodos de recirculación (loop pulsado) lo que permite generar aceleraciones y deceleraciones que son más eficientes en la remoción del biofilm adherido que velocidades constantes, ya que así varían los patrones de turbulencia y la configuración de la capa límite, lo que dificulta el establecimiento y la adhesión de los microorganismos.

Para más información véase mi artículo Turbulencia y Biofilm publicado en Farmaespaña industrial en noviembre del 2022

Materiales

Los sistemas de distribución de aguas compéndiales en su inmensa mayoría están fabricados con acero inoxidable. Para la construcción de sistemas estériles con materiales metálicos el estándar más extendido es la ASME BPE⁴ que indica que cuando los sistemas de agua compéndiales estén contruidos con materiales metálicos, el acabado superficial deberá ser inferior o igual a 0,6 µm (lo que equivale al acabado SF1) y podrá ser electropulido internamente (lo que equivaldría a SF5).

El acabado electropulido tiene varias ventajas ya que con él se obtiene una superficie más

igualada al tiempo que se reduce la proporción superficial de hierro respecto del cromo. Esto limita la potencial adhesión de bacterias y mejora la resistencia frente al rouge.

El rouge parece alterar la rugosidad de los recipientes y las tuberías. Este cambio puede afectar a la capacidad general de limpieza de los recipientes, así como a la microestructura de la superficie, lo que a su vez podría permitir que las bacterias se adhieran con mayor facilidad y, por tanto, favorecer la formación de biopelículas.

Para más información véase mi artículo Rouge and Clean utilities publicado en Farmaespaña industrial en julio del 2021

Nutrientes

Para terminar una reflexión sobre los nutrientes: la microelectrónica es un campo afín a los sistemas farmacéuticos ya que la calidad del agua a utilizar es muy elevada para evitar contaminaciones en los cada vez más pequeños canales de los transistores. De hecho, la norma actual de aplicación, la ASTM D5127 Type E-1.3⁵, es mucho más exigente que nuestras especificaciones para WFI.

La tecnología usada para generar agua de proceso para microelectrónica es radicalmente diferente a la que encontramos hoy en día en la industria farmacéutica. Por ejemplo, no se usa el acero para la distribución, y la purificación del agua se suele hacer por intercambio iónico (lechos mixtos) con regeneración in situ con productos químicos ya que las técnicas usadas en farma no permitirían alcanzar los exigentes límites establecidos para determinados iones (como el boro o el níquel) o para el TOC, para el que se establece un límite de 1 µg/L (1ppb) en punto de uso.

Esa exigencia tiene un efecto interesante ya que hace desaparecer cualquier tipo de nutriente presente en el agua, que pasa de ser un medio oligotrófico a uno estéril en el que las bacterias no tienen oportunidades para subsistir y aun menos para construir un biofilm. De ese modo es posible relajar otras exigencias relativas a materiales y sanitizaciones garantizando la calidad requerida ●

Referencias

1. EMA/INS/GMP/443117/2017
2. Membrane-Based Water for injection Systems ISPE Good practice Guide
3. Guidance on the Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products by Aseptic Processing. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (A2.1.2.7.1)
4. ASME BPE 2022 Bioprocessing Equipment
5. ASTM D5127-13 Standard Guide for Ultra-Pure Water Used in the Electronics and Semiconductor Industries

^ alsico



Nueva marca

Vestilab ahora es ^ alsico

Principal fabricante mundial de vestuario para la industria farmacéutica.
Tus expertos para el Control de la Contaminación en Sala Blanca.



MOBILIARIO



CICLO DE VIDA DEL VESTUARIO
EN BODY BOX



ULTRALIMPIEZA



RETIRADA DE RESIDUOS
Y CORROSIÓN



DESINFECCIÓN

our performance
protects yours

www.alsico.es