



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL EQUIPO RCS HIGH FLOW  
PARA MONITOREO DE MICROORGANISMOS EN AIRE AMBIENTAL**

INFORME PRESENTADO A LA ESCUELA DE BIOLOGÍA DEL INSTITUTO  
TECNOLÓGICO DE COSTA RICA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA CON EL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLERATO UNIVERSITARIO

EVELYN SOLANO HERNÁNDEZ

BAXTER PRODUCTOS MÉDICOS LTDA DE COSTA RICA

CARTAGO, 2008

## RESUMEN

---

### METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL EQUIPO RCS HIGH FLOW PARA MONITOREO DE MICROORGANISMOS EN AIRE AMBIENTAL

Evelyn Solano

En la industria de dispositivos médicos el monitoreo de microorganismos en aire permite determinar si los controles de la planta funcionan adecuadamente para mantener la cantidad de microorganismos dentro de los límites establecidos. El objetivo general de este trabajo fue desarrollar una metodología para validar el equipo RCS High Flow para el muestreo de microorganismos en aire en los cuartos limpios de la empresa Baxter Cartago. Primeramente se evaluó la recuperación de microorganismos en aire en áreas controladas y no controladas, comprobándose la capacidad del equipo para monitorear ambientes con diferente carga microbiana. Posteriormente se determinó la repetibilidad y reproducibilidad para calcular la precisión del equipo, encontrándose que fue capaz de reproducir y repetir los datos bajo las mismas condiciones ambientales y también bajo condiciones distintas. Finalmente se realizó un análisis de comparación y correlación entre el equipo RCS High Flow y el equipo RCS Standard utilizado actualmente en la empresa, determinándose que no hubo ninguna relación entre ambos por lo que no se pudo compararlos. Sin embargo se recomienda la utilización del RCS High Flow para llevar a cabo el muestreo de microorganismos en aire en la empresa Baxter Cartago debido a su capacidad de recuperación.

**Palabras claves:** *monitoreo ambiental, RCS High Flow, repetibilidad, reproducibilidad, condiciones ambientales.*

## ABSTRACT

---

### VALIDATION METHODOLOGY FOR RCS HIGH FLOW EQUIPMENT FOR AIR ENVIRONMENTAL MONITORING OF MICROORGANISMS.

Evelyn Solano

In the current environment of medical devices industries, proper air monitoring and control ensures the plant is maintaining the amount of microorganisms within the established specification limits and its controls are working properly. The general objective of this investigation was to develop a methodology to validate the RCS High Flow equipment to sample air and determine the amount of microorganisms present in several clean rooms of the company Baxter Cartago. As a first step, it was assessed the recovery of microorganisms in air for controlled and uncontrolled areas, verifying the ability of the equipment to monitor environments with different microbial load. After this, it was determined the repeatability and reproducibility to estimate the accuracy of the equipment. This instrument was able to reproduce and replicate the data under the same/different environmental conditions. Finally a correlation analysis and comparison was conducted between the RCS High Flow (new) and RCS Standard equipment (currently used) and it was determined that there was no relationship between the two instruments. However, because of its recovery capability it was recommended the use of the RCS High Flow to evaluate airborne microorganisms in Baxter Cartago.

**Keywords:** *environmental monitoring, RCS High Flow, repeatability, reproducibility, environmental conditions, clean rooms.*

METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL EQUIPO RCS HIGH FLOW  
PARA MONITOREO DE MICROORGANISMOS EN AIRE AMBIENTAL

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**



**Ing. Olga Rivas Solano  
Profesor Asesor-ITCR**



**Lic. Roberto Zumbado Salas,  
Lector - Empresa**



**Lic. Graciela Morales Barquero  
Asesor- Empresa**

## DEDICATORIA

---

A mi esposo por incitarme a seguir mis sueños y por apoyarme y ayudarme a lo largo de mi carrera.

A mis padres por su apoyo y por motivarme durante mis estudios y en los tiempos difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A la empresa Baxter Cartago por permitirme desarrollar mi trabajo de graduación y, especialmente a mis compañeros del laboratorio de Calidad por ayudarme a ejecutar el proyecto.

A los miembros del Tribunal evaluador, por su valiosa guía, y muy especialmente a la Ing. Olga Rivas, profesora tutora, por sus aportes y sugerencias.

## INDICE GENERAL

---

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>DEDICATORIA</b> .....	4
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>INDICE GENERAL</b> .....	6
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	8
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	9
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	14
<b>Dispositivos médicos</b> .....	14
<b>Cuartos limpios</b> .....	15
<b>Buenas prácticas de manufactura</b> .....	21
<b>Evaluación de niveles microbiológicos</b> .....	23
<b>Tipos de muestreadores</b> .....	25
Gravitación o sedimentación .....	26
Centrifugación .....	27
Impacto .....	27
Impinger (Impactadores en líquido) .....	28
Filtración .....	29
<b>RCS High Flow</b> .....	31
Aplicación .....	31
Principios de operación y construcción .....	31
Ventajas del RCS High Flow .....	32
Ventajas del RCS High Flow con respecto al RCS Standard .....	33
<b>Propuesta para validar del equipo RCS High Flow</b> .....	33
Criterios generales para validar el equipo RCS High Flow .....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	40
<b>Objetivo General</b> .....	40
<b>Objetivos Específicos</b> .....	40
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	41
<b>Materiales</b> .....	41
<b>Equipo requerido</b> .....	41
<b>Procedimiento propuesto para validar RCS High Flow</b> .....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	48
<b>Resultados de la de recuperación de microorganismos del equipo en áreas controladas y no controladas</b> .....	49
<b>Resultados de las pruebas realizadas para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del equipo RCS High Flow</b> .....	51
Análisis de repetibilidad .....	51
Análisis de reproducibilidad .....	54
Análisis de fuentes de variabilidad .....	56

Análisis de correlación y comparación .....	59
Análisis estadístico de la media poblacional.....	62
<b>DISCUSION DE RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>Análisis de repetibilidad .....</b>	<b>66</b>
<b>Análisis de reproducibilidad .....</b>	<b>67</b>
<b>Análisis de correlación y comparación .....</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>75</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

## INDICE DE CUADROS

---

<i>Cuadro 1. Clasificación de Cuartos Limpios de acuerdo con el tamaño y cantidad de las partículas en el aire</i>	<i>18</i>
<i>Cuadro 2. Límites de acción para diferentes áreas controladas</i>	<i>25</i>
<i>Cuadro 3. Lista de materiales requeridos</i>	<i>41</i>
<i>Cuadro 4. Lista de equipos requeridos</i>	<i>41</i>
<i>Cuadro 5. Determinación del volumen de muestreo del equipo RCS High Flow.</i>	<i>48</i>
<i>Cuadro 6. Resultados de los muestreos de aire ambiental realizados en un cuarto limpio clase 100 000 de la empresa Baxter Cartago con el equipo RCS High Flow.</i>	<i>49</i>
<i>Cuadro 7. Resultados de los muestreos realizados en la cámara de flujo laminar (control negativo) y la cafetería (control positivo).</i>	<i>50</i>
<i>Cuadro 8. Resultados de la prueba de repetibilidad en un punto específico de un cuarto controlado clase 100 000 de la empresa Baxter Cartago.</i>	<i>51</i>
<i>Cuadro 9. Resultados de la prueba de reproducibilidad en un cuarto controlado clase 100 000 de la empresa Baxter Cartago.</i>	<i>54</i>
<i>Cuadro 10. Resultados de UFC/pie3 obtenidos al realizar 30 mediciones con el equipo RCS High Flow y el equipo RCS Standard</i>	<i>60</i>

## INDICE DE FIGURAS

---

<i>Figura 1. Límite superior (LSL) y límite inferior (USL) para calcular P/T</i>	37
<i>Figura 2. Límite superior o límite inferior para calcular P/T</i>	38
<i>Figura 3. Procedimiento para muestreo de microorganismos en aire ambiental por medio del equipo de muestreo RCS High Flow (Visio)</i>	43
<i>Figura 4. Esquema para la recolección de muestras de reproducibilidad en un cuarto limpio de la empresa Baxter Cartago (Visio).</i>	45
<i>Figura 5. Esquema para la recolección de muestras en paralelo en un cuarto limpio de la empresa Baxter Cartago (Visio).</i>	46
<i>Figura 6. Resultados de microorganismos en aire con el RCS High Flow (JMP).</i>	50
<i>Figura 7. Distribución normal de los datos obtenidos en la prueba de repetibilidad (JMP).</i>	52
<i>Figura 8. Variabilidad de los resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad (JMP).</i>	53
<i>Figura 9. Gráfico por punto y análisis de regresión (JMP).</i>	55
<i>Figura 10. Gráfico de variabilidad por punto para la reproducibilidad (JMP).</i>	56
<i>Figura 11. Gráfico para todas las fuentes de variabilidad que afectan la reproducibilidad (JMP).</i>	57
<i>Figura 12. Detalle del modelo “full factorial” (JMP).</i>	58
<i>Figura 13. Valores de las fuentes de variabilidad (JMP).</i>	58
<i>Figura 14. Comparación de UFC/pie<sup>3</sup> para el mismo punto con ambos equipos (JMP).</i>	61
<i>Figura 15. Análisis de correlación y comparación entre ambos equipos (JMP).</i>	61
<i>Figura 16. Comparación de medias de ambos equipos (JMP).</i>	62
<i>Figura 17. Relación cruzada de los factores (Adaptado de Sematech y Martinich, 2001)</i>	69
<i>Figura 18. Relación anidada de los factores (Adaptado de Sematech y Martinich, 2001)</i>	70

## INDICE DE ANEXOS

---

<i>Anexo 1. Tirillas de medio de cultivo para el equipo RCS. ....</i>	<i>80</i>
<i>Anexo 2. RCS Standard .....</i>	<i>81</i>
<i>Anexo 3. RCS High Flow.....</i>	<i>82</i>
<i>Anexo 4. Volúmenes de muestreo recomendados por el fabricante (Biotest) .....</i>	<i>83</i>
<i>Anexo 5. Partes del equipo RCS High Flow.....</i>	<i>84</i>
<i>Anexo 6. Impacto.....</i>	<i>85</i>
<i>Anexo 7. Filtración.....</i>	<i>86</i>
<i>Anexo 8. Sedimentación .....</i>	<i>87</i>
<i>Anexo 9. Impinger.....</i>	<i>88</i>
<i>Anexo 10. Hoja de información .....</i>	<i>89</i>

## INTRODUCCIÓN

---

Baxter International Inc. es una compañía global médica que tiene como finalidad ayudar a personas con enfermedades complejas, tales como hemofilia, cáncer, desórdenes inmunológicos, enfermedades del riñón, entre otras (Baxter, 2008). Esta empresa se divide en tres áreas principales (unidades de negocio), clasificadas como: **BioScience, Medication Delivery y Renal.**

La planta en Costa Rica pertenece a la división de Administración de Medicamentos (Medication Delivery Division) que se dedica a la fabricación de dispositivos médicos para administración de soluciones intravenosas y sangre, instrumentos desechables para cirugía, productos para anestesia, catéteres, entre otros.

Estos productos son de suma importancia pues se utilizan en hospitales, bancos de sangre y tratamientos ambulatorios con el propósito de salvar vidas, por lo que su manufactura debe ser lo más limpia posible para evitar cualquier contaminación que pueda causar una infección o daño en los pacientes que utilizan los productos finales.

Por esta razón, los dispositivos médicos se manufacturan en áreas controladas conocidas como cuartos limpios, donde se controlan las condiciones ambientales y físicas en las que se desarrolla el producto.

Estas áreas se clasifican de acuerdo al número de partículas presentes en el aire, y en el caso de Baxter Cartago las áreas de manufactura son clase 100 000 que significa 100 000 partículas por pie cúbico (FEDERAL STANDARD 209E, 1992). Esto implica que la manufactura de los productos no es completamente aséptica y por lo tanto una vez terminados deben ser esterilizados.

Varios factores pueden influir en la cantidad de microorganismos presentes dentro del cuarto limpio como aire, superficies, materiales introducidos al cuarto controlado, y principalmente la carga microbiana aportada por las personas que trabajan dentro del área controlada, las cuales pueden diseminar en sus áreas de trabajo los contaminantes que traen en la ropa, los zapatos o la piel. Estos contaminantes pueden ser transferidos a los artículos que el trabajador toca, así como a los lugares donde se sienta o donde camina (Aluffi & Rembado, 2006).

Para controlar que estos posibles contaminantes no alteren las condiciones en las que se manufactura el producto, la empresa Baxter Cartago cuenta con el departamento de Calidad donde, específicamente el personal del Laboratorio de Calidad realiza una serie de monitoreos para garantizar el control microbiológico de los cuartos limpios. El programa de control microbiológico se basa en monitoreos periódicos, los cuales buscan dar seguimiento a las condiciones de manufactura y a los sistemas críticos dentro de las áreas controladas para asegurar que se mantienen por debajo de los límites establecidos.

Uno de estos monitoreos es el muestreo microbiológico de aire ambiental, el cual permite determinar que la cantidad de microorganismos en el aire dentro del cuarto controlado está siendo manejada adecuadamente por los sistemas de control de la planta (filtros, manejadoras de aire, etc.). Este tipo de monitoreo permite que la manufactura y manipulación de los productos sea lo más aséptica posible, antes de pasar al proceso de esterilización.

El muestreo de microorganismos en aire ambiental se realiza por medio del muestreador centrífugo RCS Standard, que se basa en el principio de la fuerza centrífuga para separar las partículas de la corriente de aire aspirada (Gil, 2005). Este equipo ha sido utilizado por años en la compañía, dando buenos resultados ya que ha permitido determinar si los límites establecidos para los cuartos limpios se mantienen dentro de los rangos establecidos en las especificaciones. Sin embargo,

con el fin de mejorar el control microbiológico de los cuartos controlados, el Laboratorio de Calidad de la empresa Baxter Cartago ha decidido evaluar un nuevo equipo, ya que con el avance de la tecnología se han creado equipos nuevos y más sofisticados que permiten la obtención de resultados más precisos durante el monitoreo de los microorganismos presentes en el aire. Dentro de estos equipos figura el RCS High Flow, el cual posee mejores características que el RCS Standard ya que es un equipo mucho más moderno y digitalizado.

Por lo tanto, se evaluará el desempeño del mismo para determinar si genera resultados reproducibles y manejables estadísticamente y sobre todo si permite cumplir los procedimientos de trabajo establecidos por la empresa.

# REVISIÓN DE LITERATURA

---

## **Dispositivos médicos**

En Costa Rica existe una diversidad de empresas dedicadas a la manufactura de productos destinados a la prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de enfermedades en los seres humanos, llamados internacionalmente “dispositivos médicos”.

El término “*dispositivo médico*” incluye instrumentos, implementos, aparatos, implantes u otro artículo similar o relacionado utilizado en tratamientos médicos (Halls, 1994).

La empresa Baxter Cartago se dedica principalmente a la fabricación de dispositivos médicos para administración de soluciones intravenosas y sangre, instrumentos desechables para cirugía, productos para anestesia, catéteres, etc. La utilización clínica de algunos de estos dispositivos se describe a continuación (Pérez, 2008):

### **Dispositivos médicos de Administración Continua**

El uso clínico de estos productos se puede generalizar en dos aspectos:

- Se utilizan en aplicaciones en donde una droga o medicamento es agregado mediante una segunda bolsa de solución y es administrado al paciente junto a una bolsa primaria de solución.
- Se utiliza típicamente en áreas de Cirugía, Medicina u Ortopedia.

### **Dispositivos médicos de Irrigación**

Los usos más comunes para los dispositivos de irrigación son los siguientes:

- Urología: irrigación de la vejiga o próstata después de una operación TUR (trans-urethral resection).

- Cistoscopia: irrigación de la vejiga para aumentar la visibilidad durante la cirugía.
- Artroscopia: irrigación del área afectada para mejorar visibilidad y remover fragmentos de tejidos en cualquier superficie del cuerpo.

### **Dispositivos médicos de sangre**

El uso clínico de estos productos puede generalizarse a aplicaciones en donde un paciente requiere transfusión de sangre o derivados de la sangre (plaquetas, glóbulos rojos o plasma).

### **Dispositivos médicos de Clintec**

Su principal uso es para aquellos pacientes que no pueden o no comen lo suficiente de acuerdo a su situación metabólica. Este tipo de productos se utiliza en lo que se conoce como Nutrición Parenteral, la cual es una compleja terapia que combina carbohidratos, lípidos, proteínas, electrolitos, vitaminas y minerales para su posterior administración intravenosa.

## **Cuartos limpios**

Para garantizar la calidad de los productos, la manufactura de estos se debe llevar a cabo en cuartos limpios o áreas controladas. Para las industrias que fabrican dispositivos médicos, los cuartos limpios deben cumplir con una serie de normas estrictas. Existen diversos requerimientos reglamentarios como los establecidos por el Food and Drug Administration (FDA), la United States Pharmacopeia (USP), normas ISO y políticas corporativas internas que permiten verificar que estas normas se mantienen (Der *et al*, 2005).

Las industrias de dispositivos médicos que venden productos a los Estados Unidos, como la empresa Baxter Cartago, se rigen por las reglas dictadas por el FDA y la USP.

La USP es una entidad que establece normas para prescripciones de medicinas y manufactura de productos para el cuidado de la salud, los cuales son manufacturados o vendidos en los Estados Unidos. Estas normas ayudan a garantizar la calidad, pureza, fuerza, y la consistencia de los productos elaborados para consumo público (USP, 2007).

El FDA es el responsable de proteger la salud pública asegurando la eficacia y seguridad de empresas dedicadas a producir dispositivos médicos, medicinas humanas y veterinarias, cosméticos, producción de alimentos y productos que emiten radiación (FDA, 2008).

El término “área controlada” es descrito por el FDA como un área en la cual es importante el control ambiental, donde se manufacturan productos que una vez terminados requieren pasar al proceso de esterilización (Whyte, 2001). Por lo tanto, un cuarto limpio posee límites definidos de partículas viables y no viables, donde las partículas viables corresponden a los microorganismos y las partículas no viables corresponden a toda materia inerte (polvo, tierra, cabellos) que pueda transportar microorganismos. Sus criterios de diseño y uso permiten reducir la introducción, generación y retención de contaminación dentro del área. El objetivo de estos cuartos controlados es preparar un producto que no sobre pase el límite establecido de pirógenos (lipopolisacáridos liberados mediante la lisis celular como parte de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas), con una cantidad baja de microorganismos y partículas. La eficiencia del proceso de esterilización, depende de mantener una carga microbiana mínima en el producto. Sin embargo, el ambiente de manufactura puede tener un impacto en la calidad microbiológica del producto terminado. La extensión de este impacto puede depender principalmente del diseño del equipo, de las prácticas de operación y del proceso (Cole, 1998).

El diseño y la construcción de cuartos limpios y áreas controladas se encuentra establecido en el Federal Standard 209E. Esta estandarización está definida por la cantidad absoluta de partículas en el aire y solamente aplica para partículas dentro

de un ambiente controlado. Además el Federal Standard 209E no caracteriza la naturaleza de las partículas en viables o no viables (FEDERAL STANDARD 209E, 1992).

Los cuartos limpios son áreas de trabajo construidas de tal manera que el diseño mantiene y asegura las condiciones ambientales, tales como humedad y temperatura y a su vez reduce la contaminación por partículas en el aire. Estos cuartos son generalmente clasificados de acuerdo con el número de partículas por unidad de volumen de aire o de acuerdo con un rango específico del tamaño de las partículas. Los dos sistemas más utilizados para la clasificación de los cuartos limpios son: el que se basa en el sistema inglés (partículas por pie cúbico) y el que se basa en el sistema métrico (partículas por metro cúbico) (Carlberg, 1995).

La clasificación de los cuartos limpios de acuerdo con las partículas se puede determinar por el tamaño y cantidad de las mismas. La Federal Standard 209E cuantifica todas las partículas de tamaño  $\geq 0.5 \mu\text{m}$ . En el cuadro 1 se muestran las clases de cuartos limpios existentes de acuerdo con el tamaño de las partículas en el aire.

**Cuadro 1.** Clasificación de Cuartos Limpios de acuerdo con el tamaño y cantidad de las partículas en el aire

Nombre de la clase	Partículas $\geq 0.5 \mu\text{m}$		
	U.S Customary	( $\text{m}^3$ )	( $\text{ft}^3$ )
M 1	-	10.0	0.283
M 1.5	1	35.3	1.00
M 2	-	100	2.8
M 2.5	10	353	10.0
M 3	-	1,000	28.3
M 3.5	100	3,530	100
M 4	-	10,000	283
M 4.5	1,000	35,300	1,000
M 5	-	100,000	2,830
M 5.5	10,000	353,000	10,000
M 6	-	1,000,000	28,300
M 6.5	100,000	3,530,000	100,000
M 7	-	10,000,000	283,000

Fuente: FEDERAL STANDARD 209 E

El nombre de la clase se define de acuerdo con el logaritmo de la concentración de partículas  $\geq 0.5 \mu\text{m}$  por  $\text{m}^3$ . Por ejemplo el cuarto clase M3 tiene un límite de partículas  $\geq 0.5 \mu\text{m}$  de  $1000/\text{m}^3$ . El logaritmo de 1000 es 3, el cual indica la clase (Whyte, 2001).

De acuerdo con el FDA el tipo de dispositivos médicos producidos en Baxter Cartago requiere de cuartos clase 100 000, lo cual significa que puede haber un máximo de 100 000 partículas por  $\text{pie}^3$ . Como se observa en el cuadro anterior este tipo de cuarto corresponde a la clase nombrada como M 6.5 donde la cantidad de

partículas mayores o iguales a  $0.5 \mu\text{m}$  es máximo 100 000 por  $\text{pie}^3$  ó 3, 530,000 por  $\text{m}^3$ .

Para cumplir con este máximo de partículas en los cuartos limpios, la compañía Baxter International Inc establece en sus especificaciones los siguientes requerimientos de diseño (ISO-8, 2008):

**Techos:** es muy poco probable que establezcan contacto con los productos y se limpian pocas veces por lo que deben ser construidos de manera que el ingreso de partículas u otros contaminantes sea mínimo (Montero, 2007). Por esta razón los puntos de penetración para utilidades o dispositivos de luz deben ser mínimos. La superficie de los techos debe ser suave, lisa, no porosa, no absorbente y compatible con los requerimientos y agentes de limpieza.

**Paredes:** al igual que los techos, estas deben presentar una superficie lisa y suave, no absorbente y compatible con los requerimientos y agentes de limpieza utilizados.

**Pisos:** los pisos se contaminan generalmente por un gran número de microorganismos y en consecuencia, deben ser diseñados para facilitar su limpieza (Montero, 2007). Estos no deben ser porosos y deben ser fáciles de desinfectar. Además la superficie debe ser resistente a químicos, proveer las características electrostáticas apropiadas y resistir las condiciones físicas asociadas con el área.

**Cambios de aire:** el diseño de los cuartos debe asegurar que el flujo de aire del área controlada se mantiene de tal manera que tanto el control de la contaminación como del medio ambiente se llevan a cabo de una manera efectiva y eficiente. Para cuartos limpios clase 100 000, se recomiendan mínimo 10 cambios de aire por hora.

**Presión de aire:** la presión diferencial positiva de aire hace que el aire salga del cuarto limpio cada vez que una de las puertas que colinda con el exterior de este se abre. Esto evita que el aire externo entre al cuarto y aumente la cantidad de

partículas o microorganismos y por ende se excedan los límites establecidos en las especificaciones.

**Humedad relativa:** El control de la humedad se emplea según los requerimientos del proceso de manufactura, del equipo, materiales, de la reducción de las cargas electrostáticas, del control del personal y de la prevención de la condensación cerca del producto.

Cuando la humedad relativa del aire decrece, disminuye el agua disponible para los microorganismos, lo que causa deshidratación y por tanto la inactivación de muchos de ellos (De la Rosa, 2002).

**Temperatura:** El control de la temperatura se emplea según los requerimientos del proceso de manufactura, del equipo, materiales y del control de la vestimenta del personal del cuarto limpio.

Este factor está muy relacionado con la humedad relativa, por lo que es difícil separar los efectos que producen ambas. La congelación no destruye los microorganismos pero les impide multiplicarse, lo que hace que sean más fáciles de eliminar con los cambios de aire. (De la Rosa, 2002).

Todos los requerimientos anteriormente citados son de suma importancia para mantener las condiciones ambientales adecuadas dentro del área de manufactura.

Existe otro factor indispensable de los cuartos limpios que es de suma importancia controlar para mantener los límites de partículas viables y no viables: el personal que trabaja dentro de estos.

El ser humano es una de las principales fuentes de contaminación microbiológicas en áreas limpias y ambientes controlados. Los microorganismos se originan tanto en las partes internas como en las partes externas del cuerpo humano. Las superficies externas del cuerpo humano como la piel, el pelo, vías respiratorias, etc, están inevitablemente en contacto con el medio ambiente (Halls, 1994). Si estos

microorganismos llegan a contaminar los productos, debido a la mala manipulación y ensamble inadecuado por parte de los trabajadores, los pacientes que los utilizan se podrían ver afectados, pues muchos productos son introducidos en el cuerpo humano, lo que puede producir una infección que cause la muerte del paciente.

## **Buenas prácticas de manufactura**

Para asegurar que la manufactura de los productos sea lo más limpia posible, dentro de la industria de dispositivos médicos existe una serie de normas de calidad que regulan la forma en que se deben realizar todas las actividades dirigidas a la producción de dispositivos médicos seguros y efectivos para los clientes. Una empresa que aspire a competir en los mercados actuales, deberá tener como objetivo primordial la búsqueda y aplicación de un sistema de aseguramiento de la calidad de sus productos. Contar con ese sistema no implica únicamente la obtención de una certificación de calidad, sino que a su vez, debe ser una filosofía de trabajo que aspira a que la calidad sea un elemento presente en todas sus actividades y en todos sus ámbitos. Debe ser un modo de trabajo y una herramienta indispensable para que la empresa se mantenga competitiva. Por lo tanto, la búsqueda de la calidad, implica aspirar a una excelencia empresarial. La gestión de calidad de una empresa de dispositivos médicos está basada en primer lugar, en las Buenas Prácticas de Manufactura o GMP's (por las siglas en inglés del término "Good Manufacturing Practices"), que asimismo son el punto de partida para la implementación de otros sistemas de aseguramiento de calidad (De La Canal, 2007).

Las GMP's se definen como los procedimientos de garantía de calidad que aseguran que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos, y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. Abarcan todos los aspectos involucrados directa e indirectamente en la fabricación de un producto en forma adecuada (producción, control de calidad, almacenamiento transporte, etc.), junto con el personal y equipos capacitados y calificados que participan en las

distintas labores. También incluye la documentación y registros de cada proceso, permitiendo rastrear la información en todas las etapas de un producto. Estas normas se establecen mediante el reglamento dictado por el FDA, lo que implica que en caso de encontrarse algún incumplimiento, el FDA puede presentar cargos de violación, recomendar el retiro de los productos de mercado e incluso solicitar el cierre de la planta (Rodriguez, 2005).

Por estas razones en Baxter Cartago se cumple con una serie de lineamientos que permiten mantener los estándares de calidad y cumplir con las GMP's ya que, estas son procedimientos de higiene y manipulación, que constituyen los requisitos básicos e indispensables para participar en el mercado. A continuación se citan algunos de las normas establecidas:

- Para minimizar la cantidad de partículas y microorganismos, el personal que labora en el cuarto limpio debe utilizar cobertores de cabello y de rostro dentro del área de producción.
- Para evitar la diseminación de partículas por medio de la ropa, el personal de producción debe utilizar la gabacha que provee la empresa y velar por el buen estado y la limpieza de la misma.
- La manipulación y ensamble de los productos se hace de manera manual por lo que el personal debe lavarse las manos con agua y jabón antes de ingresar al área de producción. El principal objetivo del lavado de manos es remover la suciedad superficial de las manos y, por consiguiente, la microflora transitoria potencialmente patógena. Una buena práctica del lavado de manos corta la cadena de transmisión de microorganismos desde las heces o la nariz a los dedos y los productos (Jiménez & Gonzalez, s.f.).
- Para mantener el número de partículas dentro de los rangos establecidos en las especificaciones y evitar la contaminación de los productos no se debe utilizar ningún tipo de maquillaje, cosméticos ni joyería dentro del cuarto de producción.

- Todo trabajador debe asegurarse de estar debidamente entrenado en cada una de las funciones que realiza y que dicho entrenamiento haya sido documentado.
- Se deben mantener las áreas de trabajo limpias y ordenadas con el fin de evitar la contaminación de producto.
- Se deben mantener las puertas de acceso al cuarto de producción cerradas para evitar el ingreso de partículas.
- Para evitar la diseminación de microorganismos se debe reportar cualquier enfermedad, sobre todo de origen viral, cortaduras o heridas.
- Con el fin de evitar la contaminación dentro de las áreas de producción no se permite consumir alimentos fuera de la cafetería, ni mucho menos dentro del cuarto limpio.

El incumplimiento de estas reglas afecta los estándares de calidad, puesto que altera las condiciones ambientales en las cuales se realiza el producto. Adicionalmente, se deben realizar una serie de monitoreos para verificar que los resultados del cuarto controlado se encuentran dentro de los límites establecidos en procedimientos y especificaciones aplicables, como se describe en la siguiente sección.

## **Evaluación de niveles microbiológicos**

Es necesario evaluar con frecuencia los niveles microbiológicos (partículas viables) en el aire y en las superficies de los cuartos limpios para confirmar que los controles de biocontaminación están operando adecuadamente (Carlberg, 1995).

En las empresas que fabrican dispositivos médicos, se realizan monitoreos que permiten verificar que la producción de los dispositivos se lleva a cabo de manera controlada. Esto se logra mediante el control (lo que se instala, utiliza o hace para disminuir el número de microorganismos) y monitoreo (pruebas para verificar que el control funciona) del medio ambiente en el cual se desarrollan los productos.

El monitoreo ambiental es un programa documentado, el cual se implementa a través de los Procedimientos de Operación Estándar o SOP's (por sus siglas en inglés Standard Operating Procedures). Estos procedimientos incluyen descripciones detalladas de los métodos utilizados para monitorear partículas y microorganismos viables en el medio ambiente. El programa debe considerar lo siguiente (Carleton, & Agalloco, 1998):

- Localización de los sitios de muestreo
- Frecuencia de muestreo
- La cantidad y tipo de actividad durante la prueba
- Tiempo de muestreo
- El tipo de medio de cultivo a ser utilizado para obtener la mayor cantidad de microorganismos representativos.
- Incubación y temperatura de las pruebas
- Procedimientos aplicables en caso de que los límites de alerta o acción se hayan excedido y métodos para análisis de tendencia
- Cuando hacer una investigación
- Cuando recomendar una acción correctiva

Un límite de alerta en las pruebas microbiológicas representa un nivel de microorganismos que muestra un cambio potencial en las condiciones normales de operación. Sin embargo, generalmente exceder los límites de alerta no implica hacer cambios definitivos, pero sí implica llevar a cabo una investigación y seguir un plan para contrarrestar los niveles. Por otra parte, un límite de acción representa el nivel de microorganismos que excede las condiciones normales de operación, por lo que inmediatamente se requiere una acción correctiva (Clontz, 1997).

El muestreo de aire es la primera de las técnicas del monitoreo usada para determinar la calidad del medio ambiente en un cuarto controlado (Carleton, & Agalloco, 1998),

El siguiente cuadro muestra los límites de acción establecidos en diferentes áreas controladas para el monitoreo del aire en los cuartos limpios.

**Cuadro 2.** Límites de acción para diferentes áreas controladas

Clase del Cuarto limpio o Área Controlada	Límites de acción
100 ó Cámara de flujo laminar	0.10 UFC/ pie <sup>3</sup>
1,000	0.25 UFC/ pie <sup>3</sup>
10,000	0.50 UFC/ pie <sup>3</sup>
100,000 (húmedo)	2.50 UFC/ pie <sup>3</sup>
100,000 (seco) incluyendo áreas de dispositivos médicos	12.50 UFC/ pie <sup>3</sup>
300,000 incluyendo áreas de dispositivos médicos	12.50 UFC/ pie <sup>3</sup>

Fuente Baxter, 2008

De acuerdo con el Cuadro 2 el límite de acción para un cuarto limpio clase 100,000 (como los cuartos de la empresa Baxter Cartago) es de 12.5 UFC/pie<sup>3</sup>.

## Tipos de muestreadores

Existen diferentes tipos de muestreadores para recolectar las partículas suspendidas en el aire, así como para determinar su distribución por tamaño. Algunos se han diseñado para el muestreo de polvo o partículas no viables, mientras que otros se usan exclusivamente para la colecta de bioaerosoles o microorganismos. En este punto es importante definir que es un bioaerosol. Para entender este concepto se debe definir primero el término aerosol. Un aerosol está compuesto de material finamente dividido y suspendido en el aire u otro ambiente gaseoso, con composiciones tan variadas como la misma materia. Ahora bien, un bioaerosol, es un

aerosol compuesto de partículas de origen o actividad biológica que pueden afectar organismos vivos a través de procesos infecciosos, farmacológicos, toxicológicos, entre otros. El tamaño de estas partículas puede tener un rango variable entre 0.5µm y 100 µm (Cox & Wathes, 1995).

A continuación se describen algunos de los muestreadores cuyo uso es más frecuente en el área de la aerobiología (disciplina que se encarga de estudiar el aerotransporte pasivo de los microorganismos, su identificación, comportamientos, movimientos y supervivencia. Esta área une los conocimientos de la microbiología, la meteorología, la física de los aerosoles y la química atmosférica), para el aislamiento de bacterias (Rosas *et al*, 2004).

### **Gravitación o sedimentación**

Este es el método más simple para la recolección de microorganismos en aire. Las partículas biológicas que viajan por el aire, se recogen en una superficie adherente (placa de petri abierta o un portaobjetos con agar nutritivo) la cual se expone al aire para recolectar las partículas por acción de la gravedad ([ver anexo 8](#)). Este método no requiere de un equipo especial y debido a su simplicidad es utilizado frecuentemente en lugar de muestreadores aerobiológicos. Sin embargo, es un método pasivo, es decir un método no volumétrico, que no brinda información sobre el volumen de aire en el cual han sido muestreadas las partículas. Además esto representa una gran cantidad de partículas en un gran volumen muestreado durante el período de exposición, debido al rápido índice de sedimentación que presentan las partículas (Cox & Wathes, 1995).

Este método tiene la ventaja de que se pueden identificar los microorganismos viables a partir de los cultivos, pero su interpretación es difícil porque no pueden relacionarse con el volumen de aire muestreado. La deposición varía con el tamaño y forma de los microorganismos, la velocidad y la turbulencia del aire. El método no es exacto cualitativa ni cuantitativamente y detecta principalmente los microorganismos

que más persisten en el aire, no detectándose, sin embargo, los microorganismos más pequeños (De la Rosa, 2002).

### **Centrifugación**

La recolección de microorganismos por centrifugación permite la creación de un torbellino que produce el impacto de las partículas suspendidas en el aire sobre la superficie de recolección. El muestreador más común de este tipo es el Biotest RCS (Centrifugal Air Sampler). En este equipo el aire es succionado por el rotor del muestreador, el cual al girar crea una fuerza centrífuga y ocasiona que las partículas impacten sobre el medio de cultivo. Alrededor del rotor se coloca una tira plástica con agar ([anexo 1](#)) en la que se desarrollan las colonias de microorganismos, después de ser retirada del equipo e incubada a la temperatura adecuada.

Algunas de las ventajas de los muestreadores centrífugos son: la capacidad de muestrear grandes cantidades de aire en un corto período de tiempo (desde 40 litros/minuto hasta 100 litros/minuto), son de fácil manejo, por lo que su uso se ha popularizado especialmente en la evaluación de la calidad microbiológica de ambientes hospitalarios e industrias farmacéuticas y de dispositivos médicos, y no requieren de incómodas bombas de aire o fuentes de poder externas para su operación ([ver anexos 2 y 3](#)) (Swarbrick & Boylan, 2000)

Sin embargo no es un equipo recomendado para el muestreo de ambientes ocupacionales donde las condiciones ambientales no son controladas, ya que la superficie de las tiras de agar se saturan fácilmente (Rosas *et al*, 2004).

### **Impacto**

El principio de colecta por impacto se basa en la tendencia de una partícula a desviarse del flujo de aire debido a la inercia, cuando la corriente de aire se curva al pasar por una superficie sólida o semisólida. Las partículas se separan de la

corriente de aire e impactan sobre la superficie (Rosas *et al*, 2004). En este método el aire es aspirado por una bomba de vacío a través de unos orificios y es obligado a impactar sobre la superficie de un medio de cultivo. El proceso de impacto depende de las propiedades de inercia de la partícula (tamaño, densidad y velocidad) y de las propiedades físicas del aparato tales como las dimensiones de la boquilla y el recorrido del flujo de aire (De la Rosa, 2002). Entre más pequeña sea la partícula más grande debe ser la fuerza de separación para producir el impacto de las mismas sobre el medio de cultivo. Esto genera la desventaja de que la fuerza de impacto es la misma en todas las partículas y puede destruir los microorganismos viables que se encuentran en estas (Horn, 2005).

Entre los equipos que cumplen este principio se encuentran el muestreador Andersen (dispositivo dividido en varios niveles en los que se colocan los soportes de retención) ([ver anexo 6](#)) y el Surface Air Sampler (SAS) en el que se distribuyen uniformemente las partículas sobre el medio de cultivo (Gil, 2005).

### **Impinger (Impactadores en líquido)**

El fundamento es similar al principio de impacto y la fuerza de inercia es esencial para separar los microorganismos contenidos en el aire y que se depositen en un medio líquido ([ver anexo 9](#)). El flujo de aire puede ser de 12,5 ó 20,0 litros por minuto. Este método requiere una bomba de vacío. Estos dispositivos, también llamados de «trampa líquida», hacen pasar el aire mediante un aspirador, a través de líquidos (generalmente soluciones tampón diluidas) que retienen los microorganismos. Este líquido puede cultivarse en placa para determinar el número de microorganismos, puede examinarse microscópicamente o puede ser analizado con ensayos bioquímicos para determinar endotoxinas (LAL), sondas genéticas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunoensayos (De la Rosa, 2002).

El empleo de este equipo no se ha reducido únicamente a la recolecta de partículas fúngicas y bacterias suspendidas en el aire, sino que también se ha empleado en la recolección de algas, amebas de vida libre y virus (Rosas *et al*, 2004).

Una de las ventajas de este método es que el medio de cultivo se puede optimizar para incrementar la eficiencia de recuperación biológica. Esto es importante porque durante el muestreo, los microorganismos en el aire, los cuales ya se encuentran en un estado estresante debido a las diferentes condiciones medio ambientales tales como luz ultravioleta, radiación y desecación, se pueden ver afectados si el medio de cultivo utilizado no es el adecuado para la recuperación de los mismos (Artiola *et al*, 2004).

La velocidad de aceleración para separar las partículas puede alcanzar la velocidad sónica. Esto puede ocasionar que los microorganismos se separen durante el muestreo y comiencen a crecer en el medio de cultivo líquido lo que incrementa la cantidad de unidades formadoras de colonia y por ende genera un resultado erróneo (Horn, 2005).

### **Filtración**

En este procedimiento el aire es aspirado a través de un filtro (con frecuencia se trata de una membrana de policarbonato) en el que las partículas se depositan, y posteriormente se procede a su cultivo en medios apropiados (Gil, 2005) ([ver anexo 7](#)).

Este tipo de muestreo posee dos grandes desventajas (Cox & Wathes, 1995):

1. Genera un efecto de deshidratación en el medio de cultivo debido a la gran cantidad de volumen de aire aspirado, ya que este volumen no está cuantificado. Esto provoca la pérdida de viabilidad de las células vegetativas debido a la desecación durante el muestreo (De la Rosa, 2002).

2. Es posible que se deba eliminar material que queda depositado en los filtros, y esto puede ser difícil debido a la eficiencia y recolecta de los filtros por los materiales depositados (De la Rosa, 2002).

Mientras los tres primeros métodos citados sólo informan de los agentes biológicos cultivables (capaces de reproducirse), el impinger y la filtración también permiten valorar la presencia de componentes biológicamente activos o productos derivados de dichos microorganismos (Gil, 2005).

No existe un método de muestreo de aire ideal para todas las necesidades, por lo que para elegir uno se debe considerar qué se quiere investigar y qué información se necesita, es decir, se debe determinar previamente si interesa saber el número total de microorganismos o sólo el número de microorganismos viables, si se desea identificar y cultivar estos microorganismos o sólo observar su morfología microscópicamente, si se quiere detectar todos los presentes o sólo los patógenos, entre otros. En función de estas premisas, se elegirá el más adecuado para cumplir con las necesidades, por lo que es muy frecuente la utilización de varios métodos para poder alcanzar el objetivo propuesto (De la Rosa, 2002).

De los métodos citados anteriormente el que se ha utilizado en la empresa Baxter Cartago es el método de centrifugación, por medio del equipo RCS Standard ([ver anexo 2](#)). Sin embargo existe un equipo nuevo y más sofisticado, el RCS High Flow, que también opera bajo el principio de centrifugación. El desempeño de este equipo será evaluado mediante la metodología planteada posteriormente en este proyecto.

A continuación se describe el funcionamiento y ventajas de éste instrumento.

## **RCS High Flow**

### **Aplicación**

El muestreador de aire RCS High Flow se utiliza para investigar la calidad microbiológica del aire ambiental, la funcionalidad de los equipos de tratamiento de aire y la efectividad de las medidas de descontaminación y control (sanitización de los cuartos controlados, limpieza de pisos, bandas, uso de gabacha y cobertor, entre otros). Este equipo es utilizado en áreas donde los conteos específicos de microorganismos no deben exceder los límites establecidos en las especificaciones y procedimientos aplicables a la empresa. El RCS High Flow proporciona un medio simple para el muestreo de microorganismos en aire en las siguientes áreas (Bioest,s.f.):

- Líneas de producción controladas y estériles en industrias farmacéuticas e industrias de dispositivos médicos (cuartos limpios y medio ambientes aislados).
- Cuartos de cirugía y unidades de cuidados intensivos de los hospitales.
- Industrias de alimentos y bebidas.
- Industrias de cosméticos.
- En general, para el muestreo de la calidad del aire en ambientes interiores y exteriores.

### **Principios de operación y construcción**

El equipo RCS High Flow opera bajo el principio de centrifugación descrito anteriormente. Esto facilita la separación cuantitativa de los microorganismos en volúmenes de muestreo de aire que van de 10 a 1500 litros (Biotest,s.f.).

La corriente de aire entra al rotor que se encuentra en el frente del instrumento ([ver anexos 3 y 5](#)) el cual gira por el movimiento de las aspas.

Estas separan los microorganismos contenidos en el aire mediante una fuerza centrífuga que los deposita en una tirilla de medio de cultivo (Biotest, 2008) ([ver anexo 1](#)).

Este opera independientemente de una fuente de poder usando baterías recargables de 9.6 voltios. Sin embargo, el RCS High Flow también puede operar con una fuente de poder opcional. Puede muestrear volúmenes de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 litros. Además, es posible introducir tres volúmenes adicionales de muestreo con un máximo de 1999 litros. La operación del instrumento se realiza mediante el teclado, el cual está integrado con una pantalla que se encuentra en el brazo de donde se toma manualmente el equipo para trasladarlo ([ver anexo 3](#)).

El rotor, en el se introducen las tirillas de agar con medio de cultivo, se coloca sobre un acoplamiento magnético. Esto permite que se pueda remover del instrumento de forma simple. Por razones de seguridad, se coloca sobre el rotor una tapa protectora de acero inoxidable, sin la cual el equipo no puede operar correctamente, ya que proporciona protección contra turbulencias ([ver anexo 3](#) y [5](#)). El RCS High Flow puede operar en posición horizontal o vertical, pero debe ser protegido de movimientos fuertes (Biotest, s.f.).

### **Ventajas del RCS High Flow**

- **Tecnología:** Basado en el principio de la fuerza centrífuga (Biotest, 2008), el cual se ha utilizado satisfactoriamente para muestrear ambientes controlados (Rosas *et al*, 2004).
- **Menor tiempo de muestreo:** El flujo de muestreo es de 100 litros / minuto (Biotest, 2008).
- **Flexibilidad y Movilidad:** Diferentes características tales como selección de diferentes volúmenes de muestreo, tiempos de espera y baterías recargables lo hacen un instrumento fácil de utilizar (Biotest, 2008).

- Diseño óptimo: El flujo de aire es expulsado en la parte trasera del instrumento, lo que evita turbulencias en el flujo del aire aspirado (Horn, 2005).
- Aseguramiento de esterilidad: Todos los componentes que están en contacto con la muestra de aire se pueden desinfectar o esterilizar por medio de desinfectantes comerciales (por ejemplo el alcohol 70/30) o esterilización en autoclave (Biotest, 2008).
- El muestreador centrífugo es al igual que el RCS Standard el único sistema con un medio de cultivo validado ([ver anexo 1](#)) de acuerdo a la ISO 14698 (norma que establece los principios y bases para la metodología de un sistema de control de biocontaminación). Este medio de cultivo permite monitorear bacterias aerobias y hongos (Horn, 2005).

### **Ventajas del RCS High Flow con respecto al RCS Standard**

A diferencia del muestreador centrífugo RCS Standard, el equipo RCS High Flow presenta una serie de características que podrían considerarse como ventajas. Entre ellas se encuentran (Biotest, s.f.):

- Su sistema aerodinámico disminuye la turbulencia.
- A diferencia del RCS, este equipo utiliza baterías recargables ([ver anexo 5](#)).
- Es un equipo nuevo y de alta tecnología que facilita el trabajo ya que es digital.
- Las aspas se encuentran protegidas, lo que evita la contaminación.
- Muestra mayor cantidad de volumen en un menor periodo de tiempo. Por ejemplo el RCS Standard muestra 80 litros en 2 minutos, mientras que el RCS High Flow muestra 80 litros en menos de un minuto.

### **Propuesta para validar del equipo RCS High Flow**

Dentro de las GMP también se encuentran incluidas las “validaciones”, herramientas esenciales que permiten establecer que los distintos procesos y procedimientos

están bajo control. El término “validación” se puede entender como el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (Rodríguez, 2005).

### **Criterios generales para validar el equipo RCS High Flow**

La calificación de un sistema de medición es un paso crítico para su utilización en un proceso o un producto. La exactitud y la precisión del sistema de medición deben ser evaluados antes de la estimación de la estabilidad y la capacidad de un proceso o producto. Para asegurar la confiabilidad de un nuevo equipo se establecen diferentes parámetros y requisitos a cumplir. El parámetro más importante dentro de la validación de un instrumento es la precisión, la cual determina la cantidad de variación en un sistema de medición. La precisión se suele separar en dos componentes: **Repetibilidad y Reproducibilidad** (Sematech y Martinich, 2001).

Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad aseguran que el sistema de medición a validar es capaz para la aplicación deseada (Sematech y Martinich, 2001). Para llevar a cabo estos estudios se deben seguir los siguientes pasos:

- Selección del equipo de medición (Sematech, & Martinich, 2001): seleccionar el equipo basado en los requerimientos, (en este caso se seleccionó el RCS High Flow).
- Desarrollar un plan: donde se establezcan los límites de especificación, revisión de estudios anteriores que permitan diseñar el experimento para determinar la capacidad del sistema de medición e identificación de potenciales fuentes de variación que afectan la medición.
- Preparación de las muestras: se considera que la validación debe reflejar al máximo las condiciones reales del ensayo. Esto se logra utilizando muestras contaminadas naturalmente o muestras inoculadas con un nivel conocido de

microorganismos contaminantes. Al respecto, el analista debe ser consciente de que la inoculación de una matriz con microorganismos contaminantes imita tan sólo de una manera superficial la presencia de contaminantes naturales (USP, 2007).

- Proceso de medición: definir puntos de medición y puntos de referencia. La localización de los puntos de muestreo se puede documentar en planos (Sematech, & Martinich, 2001).

**Repetibilidad:** cuantifica la precisión del instrumento de medición. Es la variación de los resultados cuando se realizan mediciones sucesivas del mismo mesurando en las mismas condiciones de medición (Sematech y Martinich, 2001):

- Un solo operador.
- Un mismo procedimiento.
- Iguales condiciones ambientales.
- En un período de tiempo corto.

El objetivo de la repetibilidad es determinar si la variación inherente del instrumento de medición es aceptable y estable en el corto plazo. La medición se debe hacer mediante la repetibilidad dinámica, en la cual la parte con que se realiza la medición es removida e introducida entre mediciones. Por ejemplo en el equipo RCS las mediciones se hacen por medio de la tirilla de agar, la cual se introduce en el quipo para tomar la primera muestra y luego se extrae una vez que termina el proceso. Para realizar la segunda medición se vuelve a introducir otra tirilla, y se vuelve a extraer. Esto se realiza con todas la mediciones que se lleven a cabo. La repetibilidad dinámica permite medir la variación inherente tanto del instrumento como del método (Sematech y Martinich, 2001).

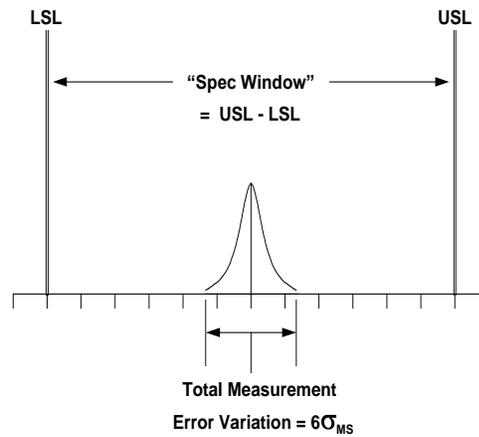
**Reproducibilidad:** cuantifica la precisión del sistema o proceso de medición. Es la variación de los resultados cuando una misma medición se realiza bajo diferentes condiciones de medición (Sematech y Martinich, 2001):

- Diferentes operadores
- Diferentes posiciones
- Diferentes condiciones medioambientales
- Diferentes tiempos

El objetivo de la reproducibilidad es determinar si la variación total (repetibilidad y reproducibilidad) del sistema de medición es aceptable, y cuantificar la cantidad de variabilidad atribuible a cada uno de los factores (operadores, días, repeticiones, condiciones ambientales) que interactúan con el equipo.

La repetibilidad para un instrumento de medición es aceptable si Precisión/Tolerancia ( $P/T_{rpt} \leq 20\%$ ), mientras que la reproducibilidad del sistema de medición es aceptable si  $P/T_{rpd} \leq 30\%$ . Tanto para repetibilidad como para reproducibilidad, P/T cuantifica la **capacidad** del sistema de medición, la cual se define como la distancia a la que una medición se acerca o se aleja de los límites de especificación. Este parámetro se puede determinar de la siguiente manera de acuerdo con los límites de especificación establecidos (Sematech y Martinich, 2001):

Dos límites de especificación :



**Figura 1.** Límite superior (LSL) y límite inferior (USL) para calcular P/T

Para dos límites de especificaciones USL (límite superior) y LSL (límite inferior) se utiliza la siguiente fórmula (Sematech y Martinich, 2001):

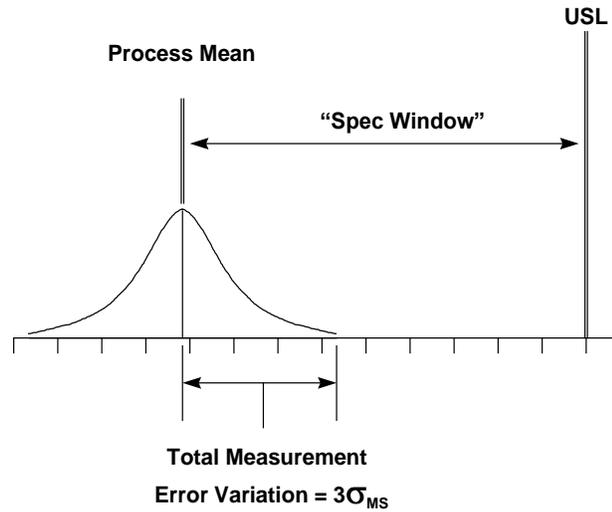
$$P/T = \frac{6\sigma_{MS}}{USL - LSL} \times 100\%$$

Donde = USL es el límite superior

= LSL es el límite inferior

=  $\sigma_{ms}$  es la desviación estándar para la repetibilidad o la reproducibilidad según sea el caso para el cual se esté utilizando la fórmula.

Solamente un límite de especificación:



**Figura 2.** Límite superior o límite inferior para calcular P/T

Para un sólo límite de especificación ya sea USL (límite superior) o LSL (límite inferior), pero no ambos, se utiliza la siguiente fórmula (Sematech y Martinich, 2001):

$$P/T = \frac{3\sigma_{MS}}{TOL} \times 100\%$$

Donde TOL =  $\text{USL} - \text{Process Mean}$  (media ideal del proceso) – LSL para el límite de especificación inferior.  
=  $\text{USL} - \text{Process Mean}$  (media ideal del proceso) para el límite de especificación superior.  
=  $\sigma_{ms}$  es la desviación estándar para la repetibilidad o la reproducibilidad según sea el caso para el cual se esté utilizando la fórmula

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad en el proceso de validación permiten conocer las características de funcionamiento del instrumento y proporcionan un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo (ENAC, 2007).

Un punto importante en la validación de un muestreador de aire es utilizar muestras reales de aire y microorganismos en aire y no ninguna prueba que involucre una inoculación directa en un medio de microorganismos conocidos (Horn, 2005). Esto permite evaluar el desempeño del equipo en las condiciones ambientales en las cuales será utilizado.

## **OBJETIVOS**

---

### **Objetivo General**

- Desarrollar una metodología para validar el equipo RCS High Flow con el fin de utilizarlo en el método de monitoreo de microorganismos en aire ambiental de la empresa Baxter Cartago.

### **Objetivos Específicos**

- Utilizar el equipo RCS High Flow en ambientes controlados y no controlados para evaluar la recuperación de microorganismos en aire ambiental.
- Calcular la repetibilidad y reproducibilidad del equipo RCS High Flow con el fin de cuantificar la precisión del instrumento y del proceso de medición respectivamente
- Determinar la relación entre el equipo RCS Standard y el equipo RCS High Flow con el fin de comparar ambos equipos.

## MATERIALES Y METODOS

---

### Materiales

En el siguiente cuadro se muestran los materiales requeridos para llevar a cabo el muestreo de microorganismos en aire.

**Cuadro 3.** Lista de materiales requeridos

Materiales
1. Tirillas de medio de cultivo producidas por Biotest ®
2. Solución alcohol 70/30
3. Guantes estériles

### Equipo requerido

En el cuadro 4 se muestran los equipos requeridos para llevar a cabo el muestreo de microorganismos en aire.

**Cuadro 4.** Lista de equipos requeridos

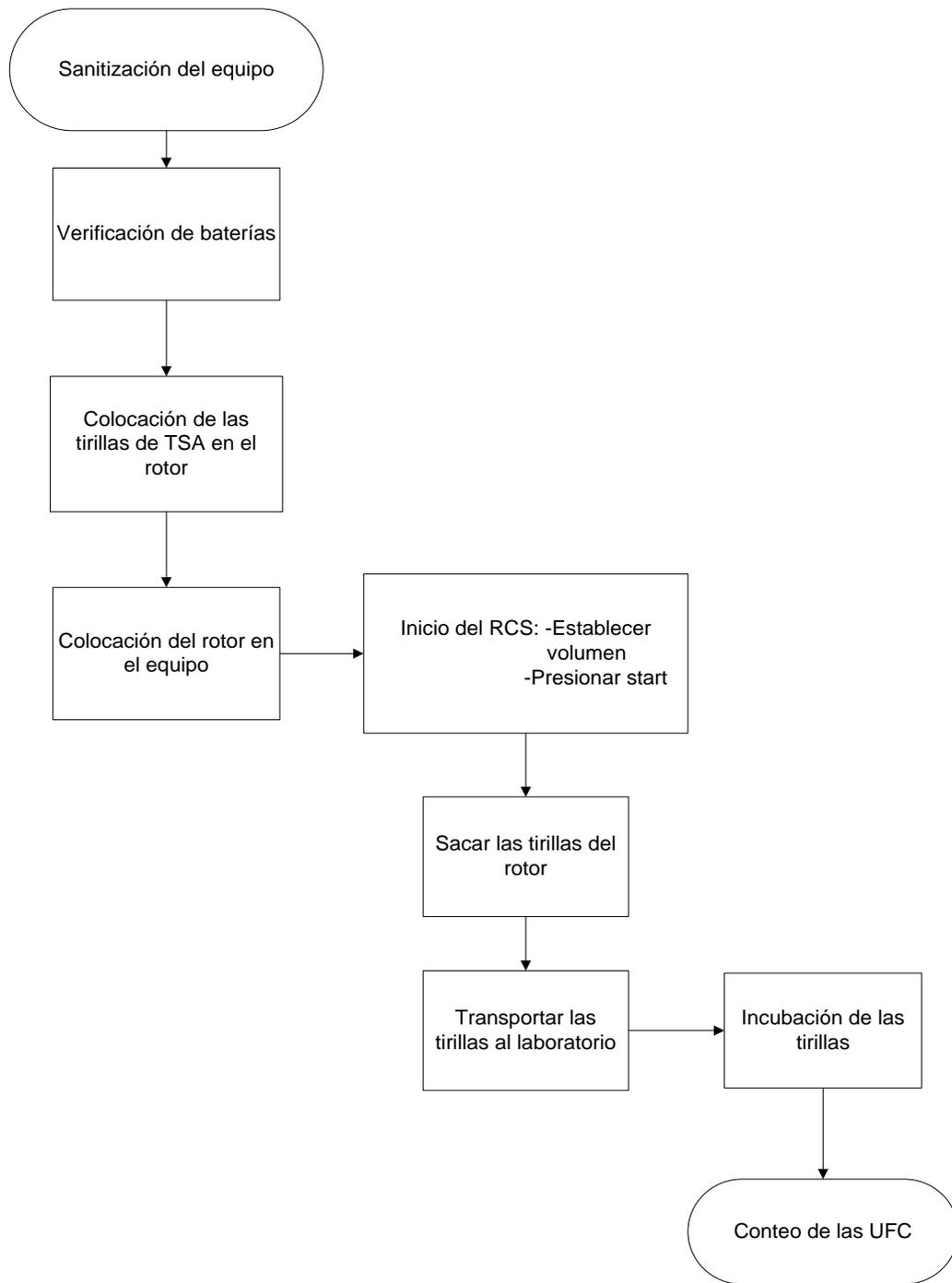
Equipo	Ámbito
RCS High Flow	(10-1000)L/min
RCS Standard	(1 – 8) min
Incubadora	(30-35)°C
Cámara de flujo laminar	Velocidad del aire 72-108 pies/minuto

### Procedimiento propuesto para validar RCS High Flow

1. Antes de utilizar el equipo RCS High Flow se midió el pH del desinfectante, el cual se utiliza para sanitizar los equipos (alcohol isopropílico 70/30), con el fin de cumplir con los requerimientos del fabricante.

2. Posteriormente se esterilizó mediante autoclave el rotor del equipo RCS High Flow de acuerdo con las condiciones establecidas por el fabricante y los procedimientos establecidos en la empresa Baxter Cartago.
3. Una vez realizado los pasos anteriores se procedió a determinar el funcionamiento adecuado del equipo de acuerdo al manual establecido por el fabricante.

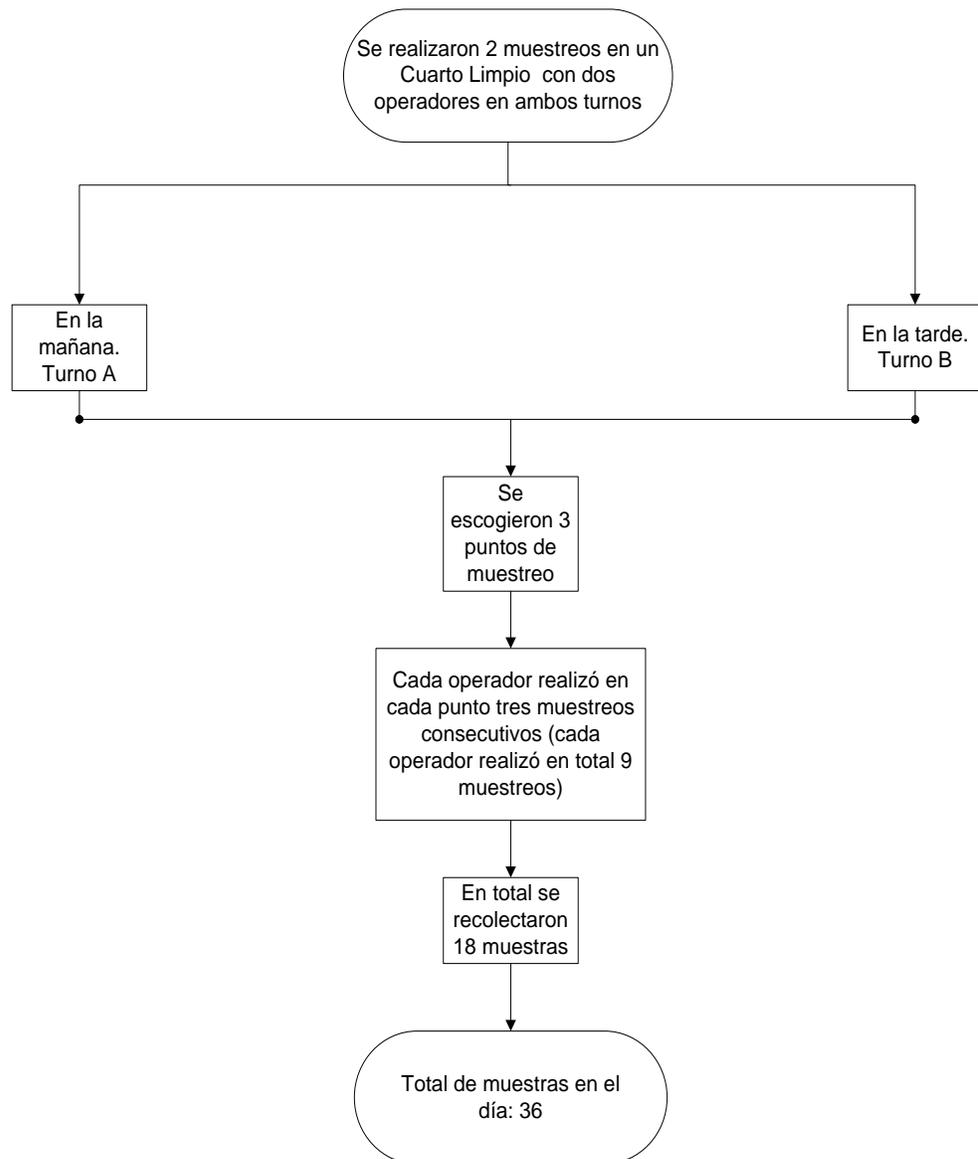
En la siguiente figura se muestra el procedimiento general para la utilización del RCS High Flow.



**Figura 3.** Procedimiento para muestreo de microorganismos en aire ambiental por medio del equipo de muestreo RCS High Flow (Visio)

4. Posteriormente se procedió a determinar cuál volumen era el más adecuado para el muestreo de los cuartos limpios en Baxter Cartago. Para llevar a cabo esta determinación se realizaron 9 muestreos en paralelo con el equipo RCS Standard (equipo utilizado actualmente) y el equipo RCS High Flow a diferentes volúmenes de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
5. Una vez determinado el volumen de muestreo se procedió a evaluar la recuperación de microorganismos del equipo RCS High Flow en áreas controladas y no controladas de la siguiente manera:
  - 5.1 Primeramente se muestrearon 9 puntos en un cuarto limpio. A cada punto se le realizaron 3 muestreos consecutivos.
  - 5.2 Posteriormente, como control positivo se realizó un muestreo en 2 puntos de la cafetería.
  - 5.3 Por último se realizaron 3 muestreos consecutivos en 2 puntos de la cámara de flujo laminar como control negativo.
6. Una vez que se determinó que el equipo era capaz de muestrear y recolectar los microorganismos del aire, se realizaron las siguientes pruebas para determinar la capacidad de medición del equipo:
  - 6.1 Primero se tomaron 30 mediciones en un solo punto del cuarto limpio para determinar la repetibilidad del equipo. Estas mediciones se llevaron a cabo en el Turno A (turno de la mañana) con un sólo operador y en un período de tiempo corto.
  - 6.2 Posteriormente se realizaron 36 mediciones para determinar la reproducibilidad del instrumento, la cual se realizó al día siguiente de haber tomado las muestras de repetibilidad. Estas pruebas se llevaron a cabo en el turno A (mañana) y el turno B (tarde) con dos operadores.

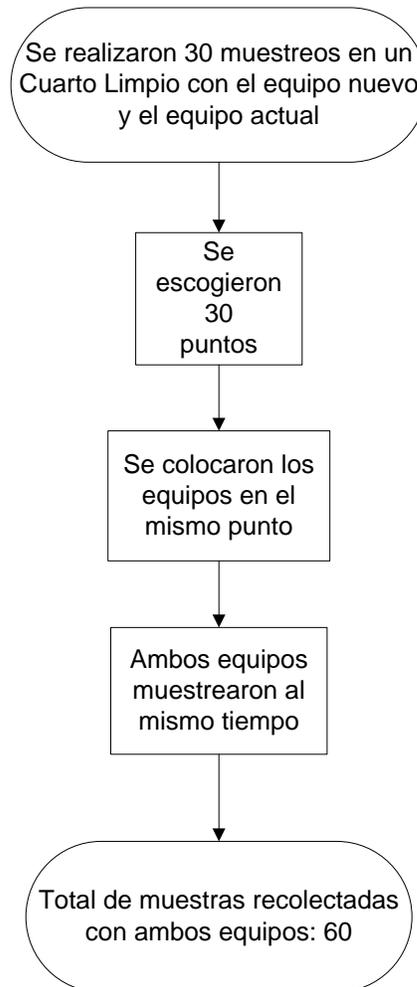
La siguiente figura describe los muestreos realizados para determinar la reproducibilidad del método de muestreo de microorganismos en aire en un cuarto limpio.



**Figura 4.** Esquema para la recolección de muestras de reproducibilidad en un cuarto limpio de la empresa Baxter Cartago (Visio).

6.3 Finalmente se realizaron 30 mediciones en paralelo con el equipo RCS Standard y el equipo RCS High Flow para determinar la relación (correlación y comparación) entre ambos equipos.

La figura 5 describe las pruebas realizadas para determinar la relación entre ambos equipos.



**Figura 5.** Esquema para la recolección de muestras en paralelo en un cuarto limpio de la empresa Baxter Cartago (Visio).

7. Incubación de la muestra: Al finalizar cada muestreo se transportaron las tirillas de TSA (Agar Tripticasa Soya) al laboratorio y se incubaron por un período de 72 horas de (30-35)°C de acuerdo a los procedimientos establecidos por la empresa.
8. Conteo de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

- Una vez finalizado el período de incubación se contaron las UFC que habían crecido sobre cada tirilla de TSA.
- Posteriormente se calculó las UFC/pie<sup>3</sup> de acuerdo con las especificaciones establecidas por el fabricante, de la siguiente manera:

**Para el equipo RCS High Flow :**

$$\text{UFC/pie}^3 = (\text{UFC} / \text{volumen}) \times 28.3$$

Donde UFC: son las unidades formadoras de colonia que crecieron sobre cada la tirilla de TSA

$$28.3 \text{ litros} = 1 \text{ pie}^3 \quad (1000 \text{ litros} = 1 \text{ m}^3 = 35.3 \text{ pie}^3).$$

Volumen: es el volumen de muestreo en litros. Para la cámara de flujo laminar se utilizó un volumen de muestreo de 320 litros y para el Cuarto Controlado se utilizó un volumen de 80 litros.

**Para el equipo RCS Standard:**

$$\text{UFC/pie}^3 = (\text{UFC} \times 0.708) / \text{tiempo}$$

Donde UFC: son las unidades formadoras de colonia que crecieron sobre cada tirilla de TSA

0.708: Volumen de separación del equipo en pie<sup>3</sup> de acuerdo con el fabricante equivalente a 40 litros por minuto basado en un tamaño de partícula promedio de 4µm

Tiempo: Tiempo de muestreo en minutos

9. Análisis estadístico: Una vez que se obtuvieron los resultados, se utilizó el programa estadístico JMP para realizar el análisis estadístico de repetibilidad y reproducibilidad.

## RESULTADOS

El cuadro 5 muestra los resultados obtenidos para determinar el volumen de muestreo adecuado para utilizar el equipo RCS High Flow. El volumen de 80 litros para ambos equipos se repite tres veces debido a que los muestreos se realizaron por tres días consecutivos, ya que era el volumen adecuado para el equipo RCS High Flow.

**Cuadro 5.** Determinación del volumen de muestreo del equipo RCS High Flow.

Equipo	Volumen de muestreo	Puntos de muestreo								
		Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6	Punto 7	Punto 8	Punto 9
		UFC/ <sub>3</sub> pie								
RCS Standard	80L en 2 minutos	1,8	2,5	9,9	4,6	2,1	1,8	5	5	6,4
RCS High Flow	200 L	3,8	1,1	3,7	2,5	1	1,4	2,3	4,8	3
RCS Standard	80L en 2 minutos	1,1	1,4	4,6	4,6	3,2	14,2	5,3	3,9	6
RCS High Flow	500L	0,6	1,2	1,9	1,2	2,9	3,7	2	2,2	1,5
RCS Standard	80L en 2 minutos	1,8	5,7	7,1	5,7	6,7	3,2	1,8	3,9	10,6
RCS High Flow	100L	7,4	3,1	7,1	4,2	2,5	2	2,3	2,5	4,5
RCS Standard	80L en 2 minutos	2,5	0,7	2,1	4,2	2,8	6,7	1,1	1,4	5
RCS High Flow	80L	2,5	0,4	2,5	1,1	1,4	1,4	3,5	0,4	5,3
RCS Standard	80L en 2 minutos	2,8	1,8	7,1	0,7	0,7	1,1	2,5	1,4	2,1
RCS High Flow	80L	2,8	1,4	7,1	0,7	2,5	0,4	2,5	1,8	1,8
RCS Standard	80L en 2 minutos	1,8	3,5	4,2	5	2,1	7,1	5,3	10,3	3,5
RCS High Flow	80L	2,1	5	4,2	5	2,5	7,1	4,6	10,6	3,5

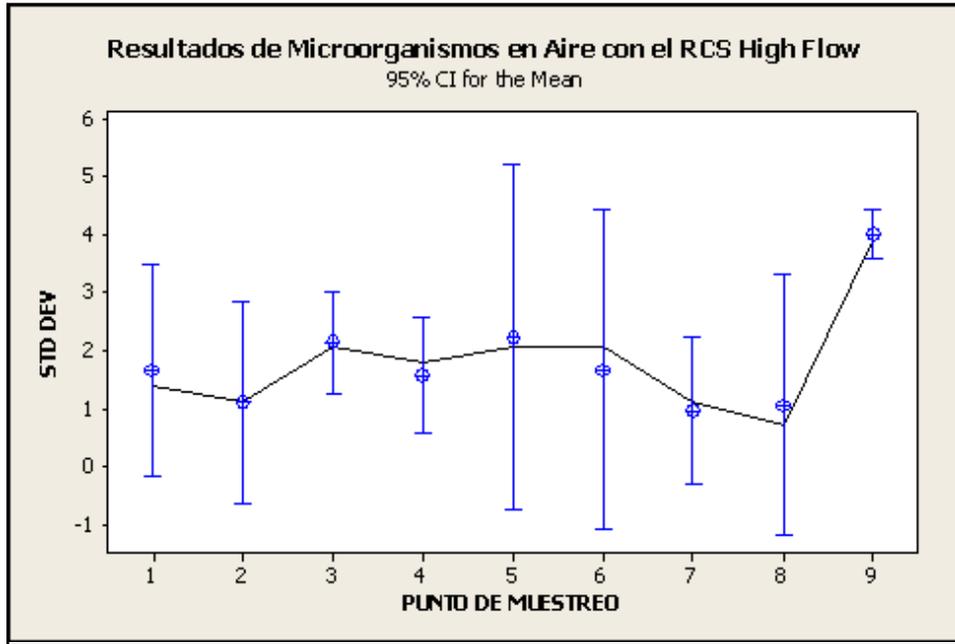
## Resultados de la de recuperación de microorganismos del equipo en áreas controladas y no controladas.

El siguiente cuadro indica los resultados obtenidos al realizar las pruebas para la evaluación de desempeño del equipo en cuanto a recuperación de microorganismos en aire en un cuarto limpio de la empresa Baxter Cartago.

**Cuadro 6.** Resultados de los muestreos de aire ambiental realizados en un cuarto limpio clase 100 000 de la empresa Baxter Cartago con el equipo RCS High Flow.

Punto de muestreo	UFC/pie <sup>3</sup>	Promedio	Desviación
1	2.5	1,7	0,7
	1.4		
	1.1		
2	1.8	1,1	0,7
	1.1		
	0.4		
3	2,1	2,1	0,4
	2,5		
	1.8		
4	1.8	1,6	0,4
	1.8		
	1.1		
5	2.1	2,2	1,2
	1.1		
	3.5		
6	2.1	1,7	1,1
	0.4		
	2.5		
7	1.4	1	0,5
	1.1		
	0.4		
8	0.4	1,1	0,9
	0.7		
	2.1		
9	3.9	4	0,2
	4.2		
	3.9		
<b>PROMEDIO</b>		<b>1,8</b>	<b>0,7</b>

La siguiente figura muestra los resultados obtenidos en cada punto de muestreo del cuadro anterior en función a la desviación estándar.



**Figura 6.** Resultados de microorganismos en aire con el RCS High Flow (JMP).

En el cuadro 7 se observan los resultados obtenidos de los muestreos realizados en la cámara de flujo laminar y la cafetería.

**Cuadro 7.** Resultados de los muestreos realizados en la cámara de flujo laminar (control negativo) y la cafetería (control positivo).

Área de muestreo	Punto de muestreo	Medición	UFC/pie <sup>3</sup>
Cafetería	1	1	8,5
	2	1	6,4
Cámara de flujo laminar	1	1	0
		2	0
		3	0
	2	1	0
		2	0
		3	0

## Resultados de las pruebas realizadas para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del equipo RCS High Flow

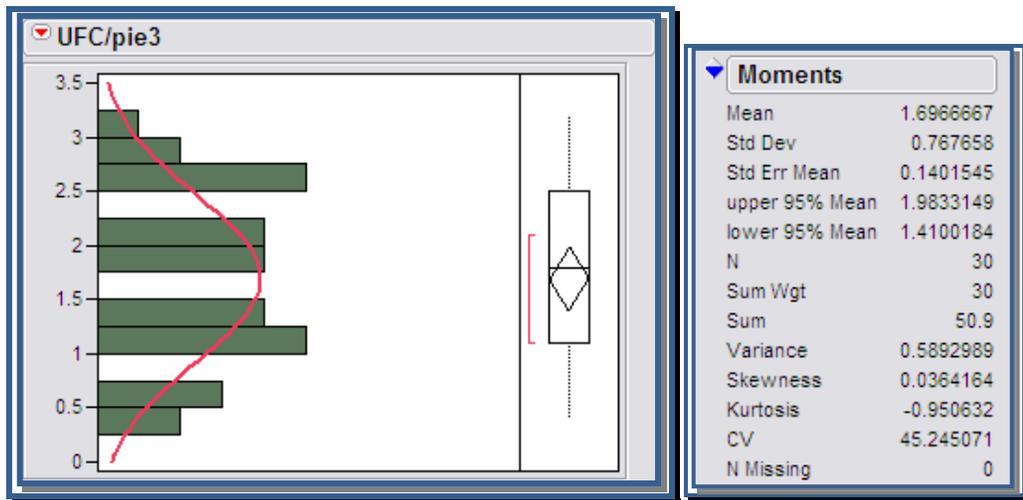
### Análisis de repetibilidad

El siguiente cuadro muestra los resultados de repetibilidad obtenidos al realizar 30 mediciones en un sólo punto.

**Cuadro 8.** Resultados de la prueba de repetibilidad en un punto específico de un cuarto controlado clase 100 000 de la empresa Baxter Cartago.

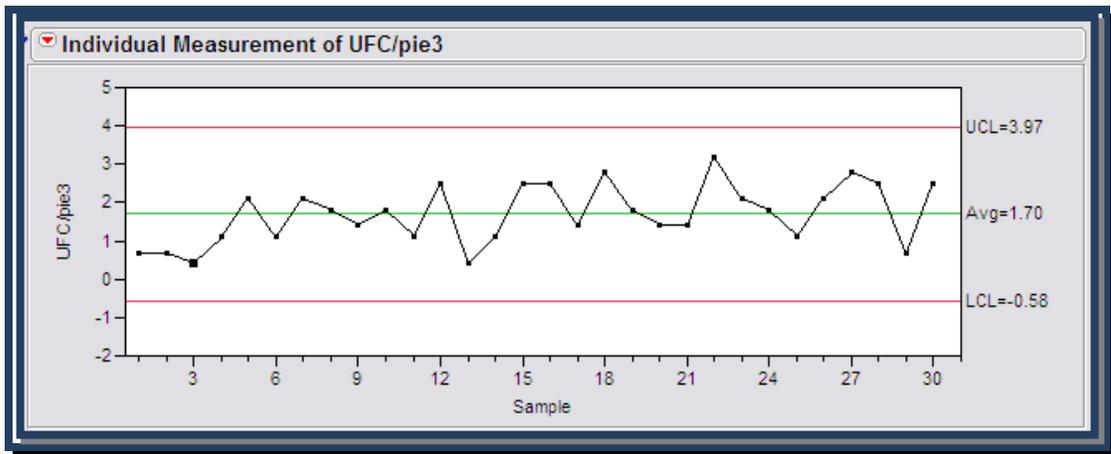
# de medición	Hora	UFC/pie <sup>3</sup>
1	10:17	0.7
2	10:18	0.7
3	10:19	0.4
4	10:21	1.1
5	10:22	2.1
6	10:24	1.1
7	10:25	2.1
8	10:27	1.8
9	10:28	1.4
10	10:30	1.8
11	10:31	1.1
12	10:32	2.5
13	10:34	0.4
14	10:35	1.1
15	10:37	2.5
16	10:38	2.5
17	10:40	1.4
18	10:41	2.8
19	10:43	1.8
20	10:44	1.4
21	10:45	1.4
22	10:47	3.2
23	10:48	2.1
24	10:50	1.8
25	10:51	1.1
26	10:53	2.1
27	10:54	2.8
28	10:55	2.5
29	10:57	0.7
30	10:58	2.5

En la figura 7 se observa la distribución normal de los datos obtenidos del cuadro 8 de acuerdo con las UFC/pie<sup>3</sup>. Además se indica que la desviación estándar es de 0.767658 y la media de 1.6966667, las cuales serán utilizadas más adelante para calcular la repetibilidad del equipo.



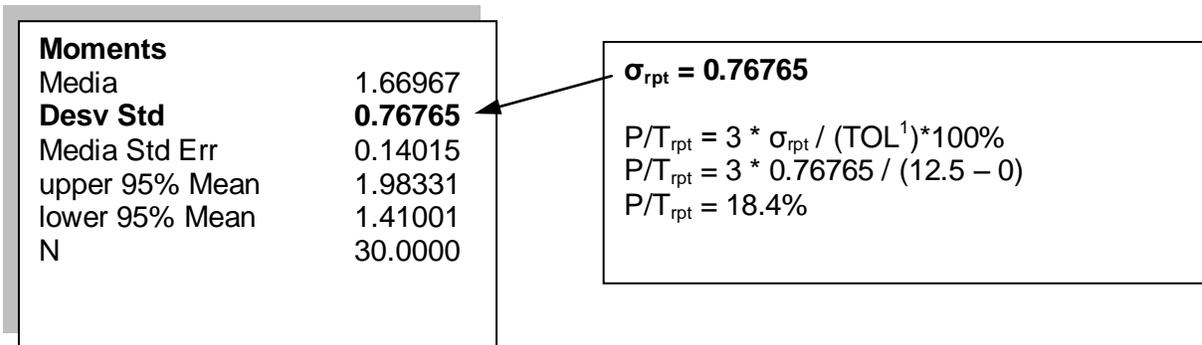
**Figura 7.** Distribución normal de los datos obtenidos en la prueba de repetibilidad (JMP).

En la siguiente figura se observa la variabilidad de los resultados de repetibilidad realizados en un período de tiempo corto.



**Figura 8.** Variabilidad de los resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad (JMP).

Para determinar la repetibilidad del equipo se realiza el cálculo de  $P/T_{rpt}$  de acuerdo con los resultados obtenidos en la figura 7.



<sup>1</sup>Donde TOL es el límite de especificación superior (12.5 UFC/pie<sup>3</sup>, ya que este es el único límite de acción de acuerdo con las especificaciones para un cuarto clase 100 000) menos la media ideal del proceso (0 UFC/pie<sup>3</sup>) para el muestreo de repetibilidad y reproducibilidad.

### Análisis de reproducibilidad.

El siguiente cuadro muestra los resultados de reproducibilidad obtenidos al realizar 36 mediciones en tres puntos de un cuarto limpio.

**Cuadro 9.** Resultados de la prueba de reproducibilidad en un cuarto controlado clase 100 000 de la empresa Baxter Cartago.

Turno	Punto	Operador	
		A	B
		UFC/pie <sup>3</sup>	UFC/pie <sup>3</sup>
Mañana	1	1,8	1,8
		0,7	2,5
		1,4	1,8
	2	0,4	0,4
		0,4	0,4
		0,4	0,4
	3	1,1	0,4
		0,7	0,7
		0	0
Tarde	1	0,4	0,7
		0,7	0
		0,4	0,4
	2	0,4	0
		0	0,4
		0,4	0,7
	3	0	0
		0	0
		0,4	0,4

Para evaluar la reproducibilidad, primero se realizó un gráfico por punto y se hizo el análisis de regresión para obtener el valor del error medio tal y como se muestra en la siguiente figura.

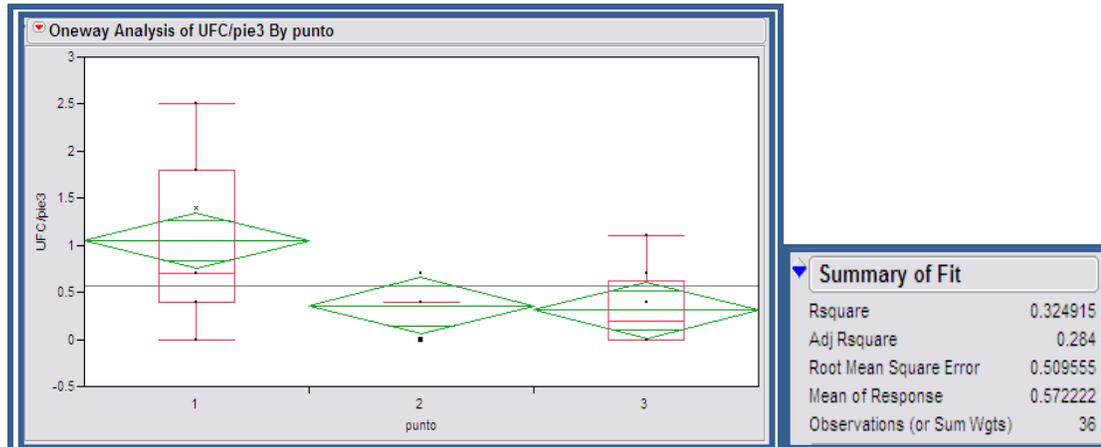


Figura 9. Gráfico por punto y análisis de regresión (JMP).

Una vez que se obtuvo el valor del error medio (figura 9) se realizó el cálculo de  $P/T_{\text{rpd}}$  para determinar la reproducibilidad del equipo.

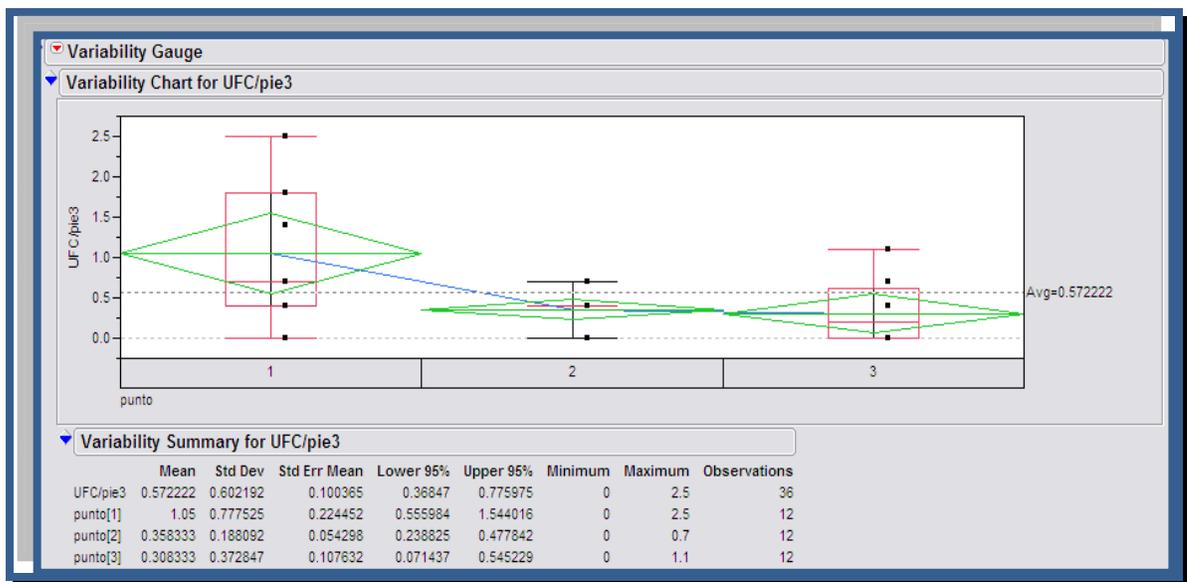
Summary of Fit	
Rsquare	0.324915
Adj Rsquare	0.284
<b>Root Mean Square Error</b>	<b>0.509555</b>
Mean of Response	0.572222
Observaciones	36

<b><math>\sigma_{\text{rpd}} = 0.509555</math></b>
$P/T_{\text{rpd}} = 3 * (\sigma_{\text{rpd}}) / (\text{TOL})$
$P/T_{\text{rpd}} = 3 * 0.509555 / (12.5 - 0)$
$P/T_{\text{rpd}} = 12.2\%$

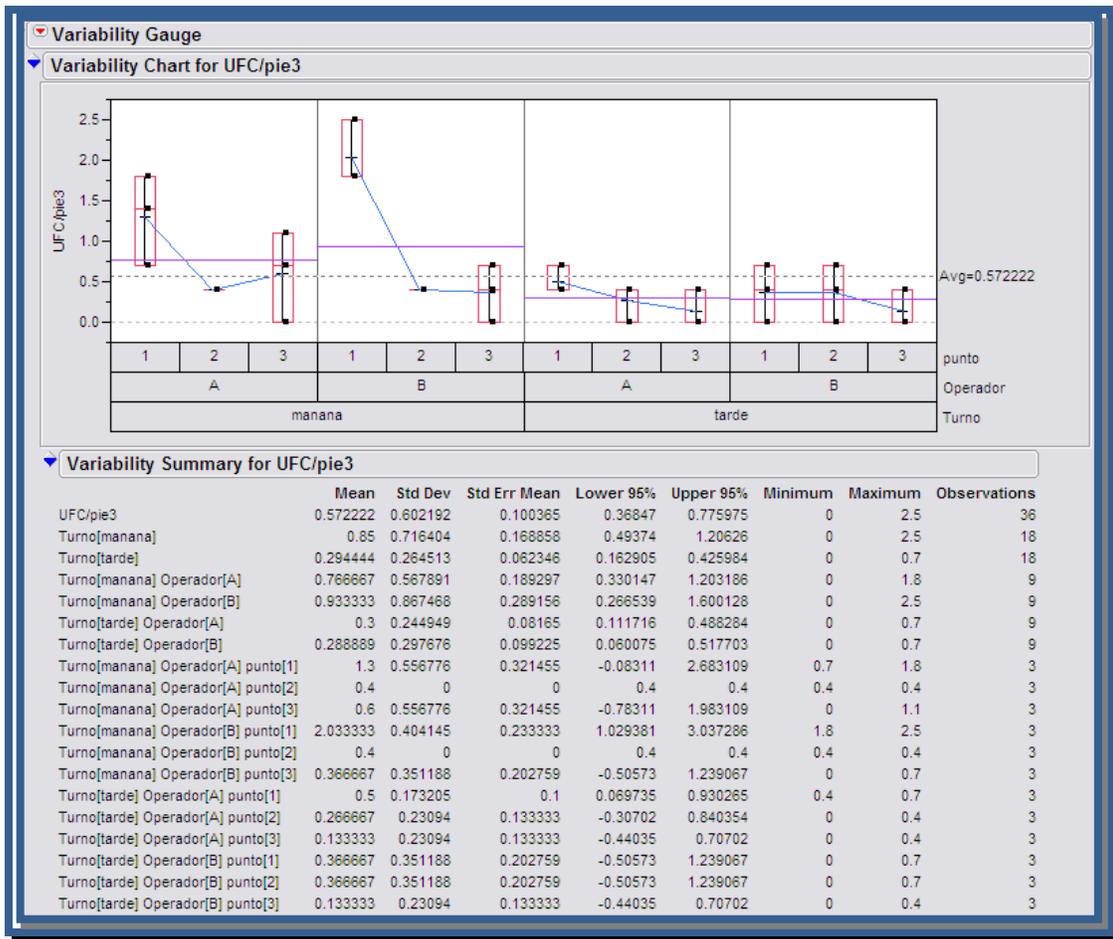
## Análisis de fuentes de variabilidad

La siguiente figura muestra la variabilidad de los resultados obtenidos en cada punto de muestreo para las pruebas de reproducibilidad. Aquí se puede observar la desviación estándar y la media en cada punto de muestreo. En este gráfico no se separan las mediciones realizadas en ambos turnos, si no que para cada punto se toman en cuenta tanto las mediciones de la mañana como las mediciones de la tarde.



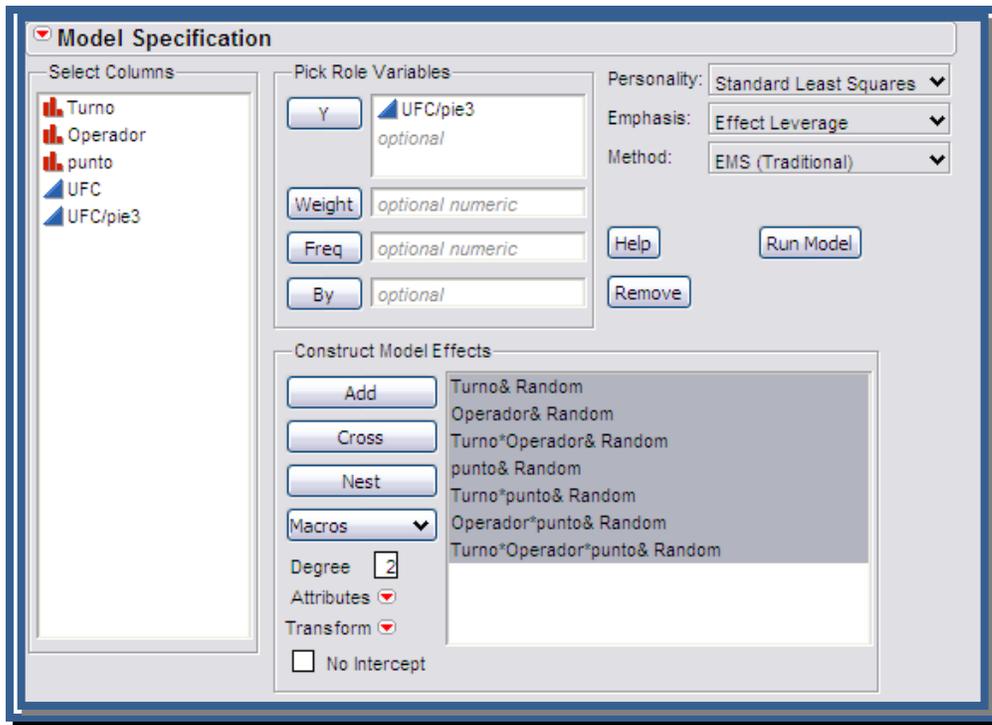
**Figura 10.** Gráfico de variabilidad por punto para la reproducibilidad (JMP).

Para comprender mejor cuales son los factores que producen la variabilidad en cada punto que se observa en la figura anterior, se realizó un gráfico donde se consideraron todas fuentes de variabilidad (operadores, turno, punto de muestreo y la interacción entre ellos), como se muestra a continuación en la figura 11.



**Figura 11.** Gráfico para todas las fuentes de variabilidad que afectan la reproducibilidad (JMP).

Para cuantificar aleatoriamente todas las interacciones de las fuentes de variabilidad descritas en la figura anterior se utilizó un modelo tipo “full factorial” como el que se muestra a continuación:



**Figura 12.** Detalle del modelo “full factorial” (JMP).

Este modelo permitió calcular los valores de las varianzas de todas las fuentes que causaron la variabilidad del sistema de medición. En la siguiente figura se observan dichos valores:

Variance Component Estimates		
Component	Var Comp Est	Percent of Total
Turno&Random	0.105	22.817
Operator&Random	0.006759	1.469
Turno*Operator&Random	-0.02213	-4.809
punto&Random	0.092778	20.161
Turno*punto&Random	0.136111	29.577
Operator*punto&Random	-0.02306	-5.010
Turno*Operator*punto&Random	0.052778	11.469
Residual	0.111944	24.326
Total	0.460185	100.000

These estimates based on equating Mean Squares to Expected Value.

**Figura 13.** Valores de las fuentes de variabilidad (JMP).

De acuerdo con los resultados obtenidos de las diversas fuentes de variabilidad que afectaron la prueba de reproducibilidad (figura 13) se calculó  $P/T_{\text{rpd}}$  de la siguiente manera:

$$\sigma_{\text{rpd}} = \sqrt{\sigma_{\text{turno}}^2 + \sigma_{\text{oper}}^2 + \sigma_{\text{turno*oper}}^2 + \sigma_{\text{punto}}^2 + \sigma_{\text{turno*punto}}^2 + \sigma_{\text{oper*punto}}^2 + \sigma_{\text{turno*oper}}^2 + \sigma_{\text{error}}^2}$$

$$\sigma_{\text{rpd}}^2 = 0.105 + 0.006759 + (-0.02213) + 0.092778 + 0.136111 + (-0.02306) + 0.052778 + 0.111944$$

$$\sigma_{\text{rpd}}^2 = 0.521011$$

$$\sigma_{\text{rpd}} = 0.721811$$

$$P/T = 3 * \sigma_{\text{rpd}} / (\text{TOL})$$

$$P/T = 3 * 0.67836 / (12.5 - 0)$$

$$P/T = 17.32\%$$

### **Análisis de correlación y comparación**

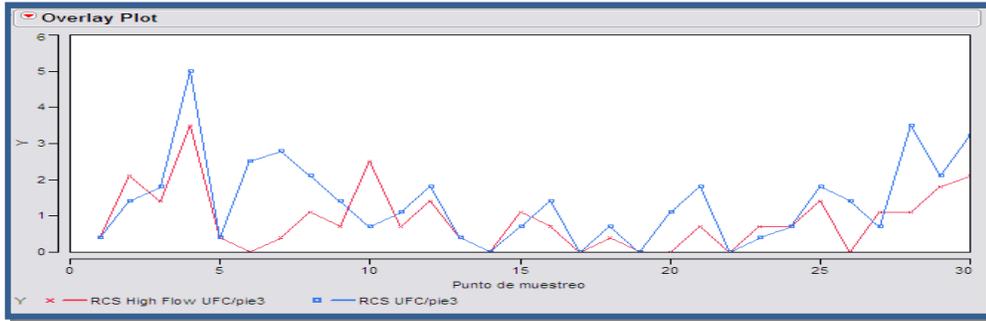
Una vez realizadas las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, se realizaron pruebas con el equipo actual (RCS Standard) y el equipo nuevo (RCS High Flow) para establecer si existe una correlación entre los mismos y definir si los resultados son comparables entre sí.

El siguiente cuadro muestra los resultados de las 30 mediciones que se llevaron a cabo al mismo tiempo con ambos equipos.

**Cuadro 10.** Resultados de UFC/pie3 obtenidos al realizar 30 mediciones con el equipo RCS High Flow y el equipo RCS Standard

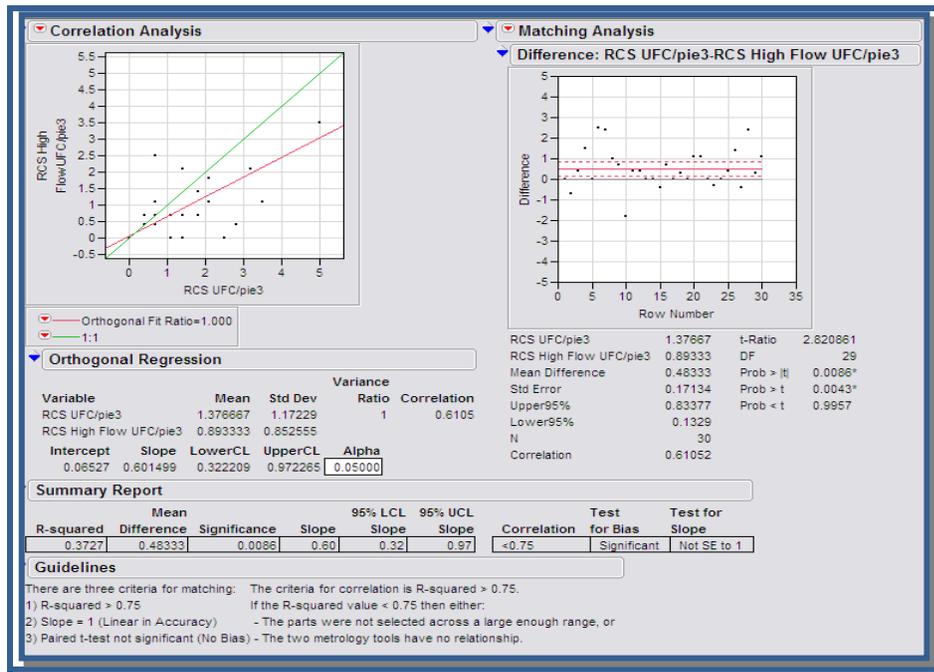
Punto de muestreo	Equipo	
	RCS High Flow	RCS Standard
1	0.4	0.4
2	2.1	1.4
3	1.4	1.8
4	3.5	5.0
5	0.4	0.4
6	0.0	2.5
7	0.4	2.8
8	1.1	2.1
9	0.7	1.4
10	2.5	0.7
11	0.7	1.1
12	1.4	1.8
13	0.4	0.4
14	0.0	0.0
15	1.1	0.7
16	0.7	1.4
17	0.0	0.0
18	0.4	0.7
19	0.0	0.0
20	0.0	1.1
21	0.7	1.8
22	0.0	0.0
23	0.7	0.4
24	0.7	0.7
25	1.4	1.8
26	0.0	1.4
27	1.1	0.7
28	1.1	3.5
29	1.8	2.1
30	2.1	3.2

La figura 14 muestra el comportamiento de los dos equipos para un mismo punto.



**Figura 14.** Comparación de UFC/pie<sup>3</sup> para el mismo punto con ambos equipos (JMP).

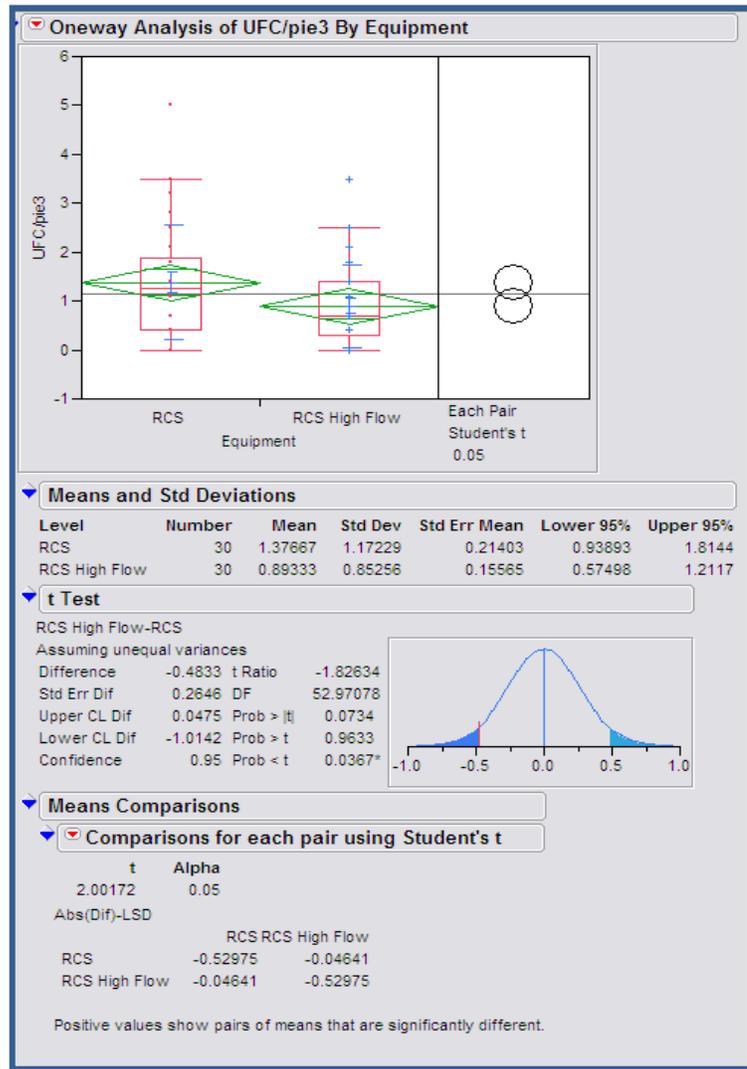
De acuerdo con los resultados obtenidos en el cuadro 10 se realizó un análisis para determinar si existe alguna relación entre el equipo RCS Standard y el equipo RCS High Flow. Esta relación se puede explicar por medio de los análisis de correlación y comparación “matching” que se muestran en la siguiente figura:



**Figura 15.** Análisis de correlación y comparación entre ambos equipos (JMP).

## Análisis estadístico de la media poblacional

Para corroborar los estudios de correlación y comparación se procedió a realizar un análisis de comparación de medias de ambos equipos mediante el análisis estadístico de t-Student. La siguiente figura muestra las desviaciones y las medias para cada equipo tomando en cuenta los resultados de las 30 mediciones realizadas con cada uno.



**Figura 16.** Comparación de medias de ambos equipos (JMP).

## DISCUSION DE RESULTADOS

---

La evaluación de microorganismos en aire es crítica en la industria de dispositivos médicos. El monitoreo de los cuartos limpios depende de instrumentos confiables que sean adecuados para el muestreo de contaminantes en el aire (Der *et al*, 2005). Por esta razón fue de suma importancia determinar cual volumen de muestreo se utilizaría, pues el equipo debía cumplir con los requerimientos establecidos por la empresa.

Para llevar a cabo esta determinación se utilizó tanto el equipo actual (RCS Standard) como el equipo nuevo (RCS High Flow). En primera instancia se conoce que el equipo RCS Standard ha sido utilizado durante más de 10 años con un tiempo de muestreo de 2 minutos. De acuerdo con el manual del fabricante estos 2 minutos corresponden a un volumen de 80 litros, ya que, el RCS Standard tiene un flujo constante de 40 litros/minuto (Biotest Hycon, s.f).

A diferencia del RCS Standard, el equipo RCS High Flow no opera por tiempo si no por cantidad de volumen (en litros), este flujo de volumen es de aproximadamente 100 litros/minuto (Biotest, s.f). De acuerdo con el fabricante ([ver anexo 4](#)) los volúmenes adecuados para el tipo de cuarto controlado de la empresa eran de 500, 200 o 100 litros (Biotest, s.f). Sin embargo, como se observa en el [cuadro 5](#) estos volúmenes de muestreo no eran los óptimos pues daban resultados muy diferentes a los que se obtenían con el equipo actualmente utilizado, ya que, en muchos casos la cantidad de unidades formadoras de colonias que crecían sobre las tirillas de agar utilizadas por el equipo RCS High Flow sobrepasaba el máximo permitido para el equipo RCS Standard (30 UFC máximo de acuerdo con los límites establecidos en los procedimientos de la empresa). Esto se dio debido a que la cantidad de partículas absorbidas por el RCS High Flow es mucho mayor que la cantidad de partículas absorbidas por el RCS Standard.

Por lo tanto, como ambos equipos funcionan bajo el principio de la fuerza centrífuga y ambos pertenecen al mismo fabricante (Biotest) se estimó que el volumen del RCS High Flow debía ser igual al volumen del RCS Standard, es decir 80 litros, para

obtener resultados similares. Este se configuró en uno de los tres volúmenes variables que tiene el equipo (que van desde 1 hasta 1999 litros), los cuales permiten introducir otros volúmenes de muestreo diferentes a los siete establecidos por el fabricante (Biotest, s.f.).

Para comprobarlo, se realizaron 9 muestreos en un cuarto limpio durante tres días consecutivos. Como se aprecia en el [cuadro 5](#) este volumen de muestreo si presentó, en la mayoría de los puntos cantidades de UFC/pie<sup>3</sup> iguales, o muy parecidas.

Aunque este nuevo equipo puede funcionar con un volumen igual al equipo actual posee la ventaja de que el muestreo se realiza en un período de tiempo menor (menos de un minuto).

Con el objetivo de comprobar mediante datos experimentales, que el equipo RCS High Flow es capaz de recuperar microorganismos en aire ambiental se llevaron a cabo muestreos en diferentes áreas. La recopilación de muestras con el equipo RCS High Flow se realizó en un Cuarto Limpio, en la Cafetería de la empresa y en la Cámara de Flujo Laminar, la cual se encuentra ubicada en el Laboratorio de Calidad. Con el fin de determinar la reproducibilidad y consistencia del equipo, se realizaron 3 pruebas consecutivas en 9 puntos diferentes del Cuarto Limpio, estas mediciones se llevaron a cabo con 12 personas aproximadamente. La cantidad de personas que laboran es significativa para los resultados obtenidos, los cuales se muestran en el [cuadro 6](#).

Como se puede observar en la [figura 6](#) existe una variación importante entre los resultados obtenidos en cada uno de los puntos de muestreo, principalmente en los puntos 1, 4, 5, 6 y 8. Esta situación probablemente se debe a que dentro del cuarto se dan aproximadamente 22 cambios de aire por hora, esta recirculación asegura la renovación del aire dentro de un área a través de la manejadora del sistema de aire ambiental, produciendo que las cantidades de microorganismos en un punto no sean constantes.

Como control positivo se realizaron muestreos en la cafetería y como control negativo se realizaron pruebas en la cámara de flujo laminar del laboratorio de

calidad. El control positivo se utilizó para determinar la presencia de microorganismos en el aire, es decir que el equipo es capaz de recolectar microorganismos siempre y cuando estén presentes. Los resultados obtenidos se indican en el [cuadro 7](#). El control positivo obtenido en la cafetería indicó que el equipo fue capaz de diferenciar áreas controladas de áreas no controladas ya que, aunque algunos de los puntos de muestreo del Cuarto Limpio fueron un poco altos, ninguno de ellos sobrepasó el control positivo de la prueba. Además los resultados del Cuarto Limpio se encontraron dentro de los límites de alerta establecidos en los procedimientos de trabajo de la empresa ( $\leq 5.7$  UFC /pie<sup>3</sup>), y aunque el área de la Cafetería no tiene un límite de especificación establecido, si se compara con los resultados obtenidos en el Cuarto Controlado estos sobrepasan los límites de alerta. El [cuadro 7](#) también muestra los resultados obtenidos en la cámara de flujo laminar. Estos fueron 0 UFC/pie<sup>3</sup>, lo que implica que el equipo es capaz de procesar diferentes muestras de aire donde existe la presencia o ausencia de microorganismos y dar un resultado proporcional a la medición que se espera, pues de acuerdo con las especificaciones establecidas en la empresa, la cámara de flujo laminar debe presentar como máximo 0.10 UFC/pie<sup>3</sup>.

El volumen de muestreo para la cámara de flujo laminar es igual que el del RCS Standard de 320 litros. Este volumen se estableció porque, como se mencionó, ambos equipos funcionan bajo el mismo principio y por lo tanto los volúmenes de muestreo en las diferentes áreas serán los mismos.

Otro control negativo del equipo fue la incubación de tirillas de medio de cultivo sin usar, cada vez que se realizaba un muestreo. Estas permitieron determinar que el crecimiento de microorganismos en las tirillas de agar utilizadas para la cafetería y el cuarto limpio se dio por la captura de microorganismos del equipo y no porque el medio estuviera contaminado. Esto permitió establecer que el RCS High Flow como tal no afectó o favoreció el crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo utilizado para realizar el muestreo.

Una vez que se evaluó que el equipo recuperaba microorganismos en diferentes áreas, se procedió a determinar si el RCS High Flow era capaz de reproducir y repetir los resultados bajo las mismas condiciones ambientales y bajo condiciones ambientales diferentes. Esto se realizó en un cuarto controlado de la empresa Baxter Cartago con el fin de utilizar muestras reales de aire.

## **Análisis de repetibilidad**

La repetibilidad se midió por la desviación estándar ( $\sigma_{rpt}$ ) de las mediciones repetitivas realizadas en un período de tiempo corto (Sematech y Martinich, 2001 & USP, 2007).

El [cuadro 8](#) contiene los resultados obtenidos de 30 mediciones efectuadas en un mismo punto del cuarto limpio. Se eliminaron todas las posibles fuentes de variación utilizando un mismo operador, quien llevó a cabo todas las pruebas en una mañana y en el menor tiempo posible (aproximadamente 2 minutos entre cada muestreo).

Además se realizó una repetibilidad dinámica en la que por cada medición se usaba una tirilla diferente. Esto permitió medir la variabilidad inherente del instrumento y del método de medición (Sematech y Martinich, 2001).

De acuerdo con la [figura 7](#) los datos siguieron una distribución normal, pues fueron el resultado de la acción de muchos factores que actuaron en forma independiente y con influencias pequeñas e iguales (Sentís *et al*, 2003). La [figura 8](#) muestra que no existieron resultados fuera de límite (dentro de los límites de confianza del gráfico los cuales son  $UCL= 3.97$  y  $LCL=0.58$ ). Estos límites se establecieron mediante el programa estadístico JMP, el cual tomó en cuenta una serie de reglas de tendencia para evaluar cuando un proceso es estable. De acuerdo con esta figura y con la figura 7 (en la cual, los datos se distribuyeron de manera normal) se puede determinar que las mediciones fueron estables en el período de tiempo en el cual fueron tomadas (Der *et al*, 2005).

Además, un sistema de medición estable es aquel donde la distribución del error de medición es constante y predecible en el tiempo, con respecto a la media y la

desviación estándar. Así, un sistema de medición estable tiene un error de medición sin cambios repentinos ni puntos fuera de límite (Sematech y Martinich, 2001).

Como se mencionó en la revisión de literatura la repetibilidad se calcula por medio de  $P/T_{rpt}$ . Donde  $P/T$  cuantifica la capacidad del sistema, la cual se define como la distancia en la que una medición se acerca o se aleja de los límites de especificación. La regla general en análisis estadístico es (Sematech y Martinich, 2001):

- Equipo Manual:  $P/T_{rpt} \leq 10\%$ .
- Equipo Automático:  $P/T_{rpt} \leq 20\%$ .

El RCS High Flow es un equipo automático ya que se programa para que funcione de manera adecuada, por lo tanto se utiliza como referencia  $P/T_{rpt} \leq 20\%$ .

Como se mencionó en el [cuadro 2](#), el límite de especificación (límite de acción) para un cuarto clase 100 000 como los que se encuentran en la empresa Baxter Cartago, es  $12.5UFC/pie^3$ . Este límite es el que se utiliza para calcular  $P/T$ .

Dado que se cuenta con sólo un límite de especificación, la fórmula para calcular el  $P/T_{rpt}$  es la siguiente:

$$P/T_{rpt} = 3 * \sigma_{rpt} / (TOL) * 100\%$$

Con los resultados obtenidos en la figura 7 se realizó el cálculo y se determinó que  $P/T_{rpt} = 18.4\%$ , (menor a 20%), por lo que el equipo pasó la prueba de repetibilidad. Es decir la variación inherente del instrumento de medición fue aceptable y estable en el corto plazo (Sematech y Martinich, 2001).

## **Análisis de reproducibilidad**

La reproducibilidad se midió por medio de la desviación estándar ( $\sigma_{rpd}$ ) de mediciones tomadas bajo diferentes condiciones (USP, 2007). La prueba de reproducibilidad en este trabajo se estimó tomando en cuenta tanto la repetibilidad como la reproducibilidad, para obtener la desviación estándar total del sistema de medición  $\sigma_{ms}$  (Sematech y Martinich, 2001).

La estimación de la repetibilidad en el estudio de reproducibilidad es más detallada que la del análisis de repetibilidad, ya que (Sematech y Martinich, 2001):

- La estimación del análisis de repetibilidad está basado solamente en un punto de muestreo y en un sólo operador, juntos en el tiempo.
- En cambio, la estimación de la repetibilidad en el análisis de reproducibilidad se obtiene a través de muchos más factores, entre ellos los diferentes puntos de muestreos, los operadores, turnos, etc ([ver cuadro 9](#)).

Como se muestra en la [figura 9](#), el cálculo de  $P/T_{\text{rpd}}$  se realizó mediante el análisis de regresión para obtener el valor del error medio. De acuerdo con esta figura se observa que la desviación estándar en el punto 1 fue mayor que en los puntos 2 y 3. Esto se produjo debido a que se utilizaron dos operadores y los microorganismos presentes en cada punto no son los mismos por los cambios de aire en el cuarto controlado y el flujo del personal que trabaja en el mismo. Esto quiere decir que existe una interacción entre los factores y el sistema de medición ([figura 10](#)). Para los análisis de reproducibilidad la regla general es  $P/T \leq 30\%$ , ya que los impactos de sistemas de medición con  $P/T > 30\%$ , han sido considerados tradicionalmente como inaceptables (Sematech y Martinich, 2001).

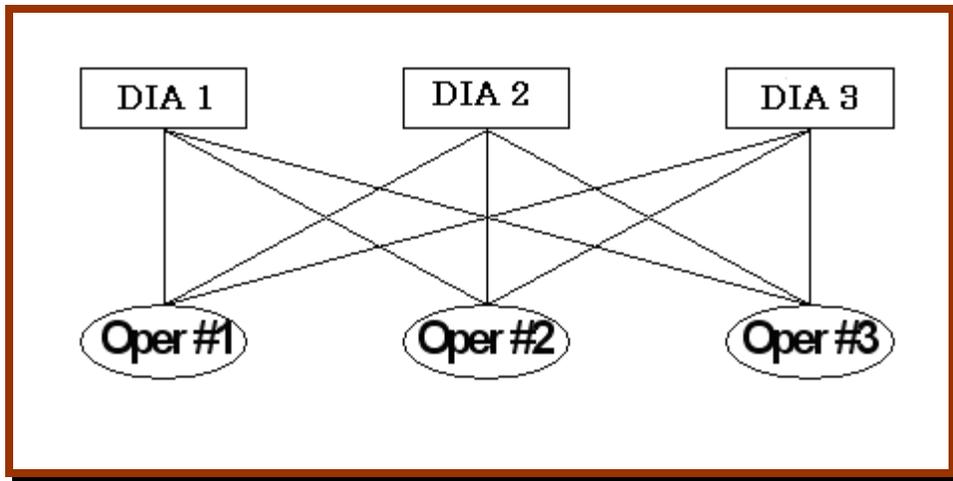
Por lo tanto, el sistema de medición realizado con el equipo RCS High Flow es capaz para la prueba de reproducibilidad pues presentó un  $P/T_{\text{rpd}} = 12.2\%$ .

Para comprender mejor como interaccionan los factores con el instrumento se presenta un gráfico donde se muestren todas las fuentes de variabilidad. Este gráfico permite determinar con mayor exactitud cuáles fueron los factores que produjeron las variaciones en el punto 1 de los gráficos de las figuras [9](#) y [10](#). Como se observa en la [figura 11](#), el punto 1 del turno de la mañana, para ambos operadores, presentó valores significativamente más altos que el resto de las mediciones realizadas en los demás puntos tanto de la mañana como de la tarde. Esto quiere decir que las condiciones ambientales en el turno A eran muy diferentes a las del Turno B, debido a que en la tarde la concentración de microorganismos en el aire es mucho más baja que en el turno de la mañana, probablemente debido a que la cantidad de personas

es menor. En el turno B trabajan únicamente 7 personas, mientras que en el turno A trabajan 12 personas.

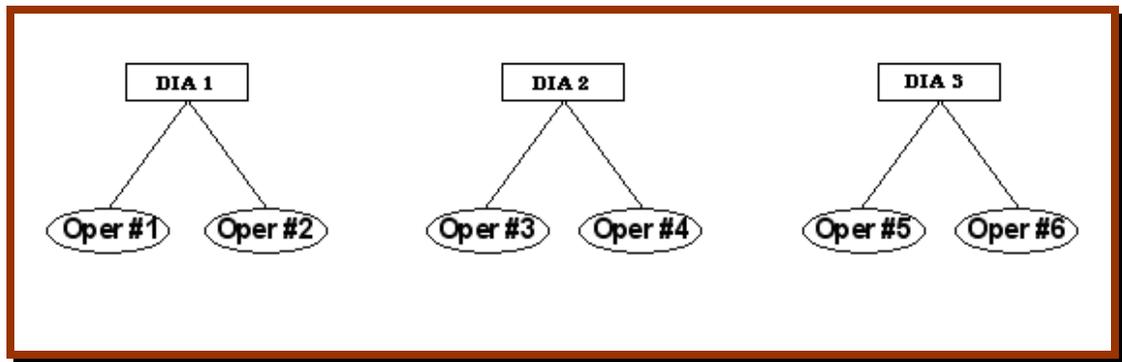
Por otro lado, es importante establecer la relación que existe entre los factores que producen variabilidad, la cual puede darse de dos maneras:

- Cruzada: si el factor A se cruza con el factor B, significa que los niveles (punto de muestreo, días, operadores, etc) del factor A son los mismos niveles del factor B (figura17).



**Figura 17.** Relación cruzada de los factores (Adaptado de Sematech y Martinich, 2001)

- Anidada: el factor A es anidado con el factor B si los niveles (punto de muestreo, días, operadores, etc) del factor A son diferentes a los niveles del factor B, como se demuestra en la figura 18 (Sematech y Martinich, 2001).



**Figura 18.** Relación anidada de los factores (Adaptado de Sematech y Martinich, 2001)

De acuerdo con los muestreos realizados la relación entre los factores es cruzada, ya que ambos operadores llevaron a cabo las pruebas el mismo día, en los mismos puntos de muestreo y con igual número de repeticiones.

Para determinar si los factores observados en la [figura 11](#) fueron los que afectaron más el sistema de medición, se utilizó un modelo llamado “full factorial” el cual se muestra en la [figura 12](#). Este método permitió determinar la variación total del sistema por medio de la suma de todas las varianzas de los factores que se muestran en la [figura 13](#).

El resultado de esta suma indicó que  $P/T_{\text{rpd}}$  ( $P/T_{\text{oms}}$ ) fue menor al 30%, lo que estableció que el equipo RCS High Flow fue capaz de reproducir y repetir las mediciones correctamente.

Además, de acuerdo con las varianzas presentadas en la [figura 13](#), se pudo determinar que los factores que más contribuyeron con la variación de las mediciones son los factores del turno y el punto de muestreo, pues son los que presentan el componente de varianza más alto (Sematech y Martinich, 2001).

Estos factores producen variación debido a que el movimiento del personal y la entrada y salida tanto de las personas que trabajan dentro del Cuarto Limpio como

de personas de limpieza, generan cambios en los flujos de aire. Las personas son la mayor fuente de contaminación debido a los microorganismos y a las partículas no viables que transportan (Sharp & Goldstein, 2002).

Cabe destacar que cuando se llevaron a cabo las pruebas se le solicitó al personal de limpieza que no realizara ninguna tarea que pudiera levantar partículas, con el fin de evitar la alteración de los resultados. También se le solicitó al personal que labora en el área controlada que no pasara cerca del equipo mientras este estaba muestreando, para evitar posibles turbulencias que afectarían la muestra. Pero esto no implica que el personal no tenga que moverse en el cuarto controlado para llevar a cabo sus tareas. El movimiento del personal hace que el flujo del aire circundante varíe, y por lo tanto varía la cantidad de microorganismos en cada punto de muestreo. Además, la influencia en los cambios del flujo de aire debido a la manejadora del sistema de aire ambiental y la diferencia en la cantidad de personas que trabajan en ambos turnos hace que la concentración de microorganismo sea distinta en cada punto.

## **Análisis de correlación y comparación**

La relación entre dos sistemas de medición puede ser evaluada por muchas razones, entre ellas (Sematech y Martinich, 2001):

- Reemplazar un instrumento existente por un instrumento nuevo.
- Aumentar capacidad agregando una segunda herramienta.
- Comparar dos sistemas de medición.

De acuerdo con la relación anterior dos equipos de medición pueden estar correlacionados, pueden ser comparados o no tener ninguna relación.

En Baxter Cartago el equipo RCS High Flow se adquirió con el fin de obtener un instrumento más nuevo en tecnología que el RCS Standard, para poder reemplazarlo.

Para determinar si el equipo RCS Standard y el equipo RCS High Flow tienen alguna relación entre sí, se tomaron 30 mediciones para cada equipo en 30 puntos al azar ([ver cuadro 10](#)). Ambos equipos se colocaron en el mismo punto, uno al lado del otro, y se pusieron a funcionar al mismo tiempo (Távora *et al*, 2003). Aunque existe la posibilidad de que un equipo puede interferir con las mediciones del otro causando turbulencias entre ellos, se pusieron a muestrear simultáneamente con el fin de garantizar que el punto de muestreo es el mismo para el equipo RCS Standard y el equipo RCS High Flow (Metha *et al*, 1996).

La [figura 14](#) muestra el comportamiento de ambos equipos en cada punto de muestreo. Como se observa existe gráficamente una tendencia a tener el mismo resultado en cada punto, es decir, aparentemente ambos equipos recuperan cantidades de microorganismos muy parecidas.

En la [figura 15](#) las guías (guidelines) en la parte inferior izquierda muestran que el coeficiente de correlación debe ser  $> 0.75$  para que exista correlación entre los equipos, sin embargo, al realizar el análisis de correlación matemático el coeficiente de correlación (recta de mejor ajuste) fue de 0.6105 (menor a 0.75), lo que indicó que no tienen una relación directa.

Cuando dos equipos se correlacionan hay un camino confiable para asociar las mediciones de un instrumento con las mediciones del otro. Esto quiere decir que se puede predecir las mediciones de un equipo mediante las mediciones que se obtuvieron con el otro instrumento (Sematech y Martinich, 2001). Por esta razón no se puede decir que los equipos RCS Standard y RCS High Flow tienen alguna correlación, pues se observa en el gráfico de la [figura 15](#) (lado izquierdo) que existe un desfase entre ambas rectas y por lo tanto las mediciones no son similares.

Cuando dos instrumentos no tienen correlación, tampoco pueden ser comparados, tal y como se observa en el análisis de comparación de la [figura 15](#) (lado derecho).

Dos sistemas de medición se pueden comparar cuando las mediciones de ambos son equivalentes, es decir no se puede determinar cual instrumento recolectó las mediciones (Sematech y Martinich, 2001).

Se esperaría que los equipos tuvieran alguna relación entre sí, ya que pertenecen al mismo fabricante, utilizan el mismo volumen de muestreo (80 litros) y funcionan bajo el mismo principio de centrifugación. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que lo que se está muestreando es aire ambiental en un cuarto controlado, donde la concentración de microorganismos en el aire debe variar constantemente para mantener los resultados dentro de las especificaciones establecidas. Además, la temperatura del aire, presión, el contenido de humedad, velocidad del viento y el movimiento de personal que produce variaciones en el flujo de aire en cada punto, son algunos de los factores que pueden afectar el funcionamiento de un muestreador de aire (Der *et al*, 2005). Esto posiblemente hace que los equipos RCS Standard y RCS High Flow no tengan ninguna relación entre sí y por lo tanto, no exista un camino confiable para asociar los datos de ambos.

Como un análisis aparte, se realizó una comparación entre las medias de la población tomada para cada equipo, esto con el fin de evaluar si estas poblaciones son estadísticamente equivalentes.

Las pruebas realizadas con ambos equipos se llevaron a cabo en los mismos puntos, con el mismo operador y al mismo tiempo. La [figura 16](#) muestra el gráfico y los datos obtenidos al realizar un análisis estadístico de t-Student de acuerdo con los datos obtenidos en el [cuadro 10](#). La prueba de t- Student permite determinar la media de una población distribuida normalmente, cuando el tamaño de la muestra es pequeña (Sentís *et al*, 2003).

Como se observa, la desviación de ambos equipos es significativamente diferente, ya que las medias de las poblaciones no son estadísticamente iguales (la media para el equipo RCS Standard es 1.37667 mientras que para el RCS High Flow es de 0.89333). Esto corrobora el análisis anterior de que no se existe correlación ni comparación entre los equipos RCS Standard y RCS High Flow.

Es importante rescatar que a pesar de que los análisis de correlación y comparación no dieron resultados positivos, el RCS High Flow sigue siendo capaz para las pruebas de reproducibilidad y repetibilidad.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

---

### Conclusiones

- De acuerdo con los resultados obtenidos para los controles negativos, se puede determinar que el equipo como tal no afecta o favorece el crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo utilizado para realizar el muestreo.
- El RCS High Flow es capaz de diferenciar mediante los resultados obtenidos, áreas controladas de áreas no controladas.
- A diferencia del equipo RCS Standard el muestreo se realiza en un período de tiempo corto lo que agiliza el trabajo de las personas que lo utilizan.
- La variabilidad obtenida en los resultados del cuarto limpio indica que el equipo es capaz de determinar si las condiciones del cuarto limpio son las adecuadas para llevar a cabo un proceso de manufactura.
- El  $P/T_{rpt}$  es menor a 20% lo que indica que la variación inherente del instrumento de medición es aceptable y estable en el corto tiempo.
- El  $P/T_{rpd}$  es menor a 30% por lo que se concluye que el sistema es capaz de reproducir y repetir las mediciones correctamente.
- Los factores que más afectan la reproducibilidad del método son el turno y los puntos de muestreo debido a la diferencia de microorganismos presentes en el aire por los controles ambientales que tienen los cuartos controlados y a la cantidad de personas presentes en cada turno.
- Aunque ambos equipos no se comparan ni se correlacionan, el RCS High Flow se puede utilizar para llevar a cabo el muestreo de microorganismos en aire.
- Con los resultados obtenidos se pudo cumplir con el objetivo principal de este protocolo y por lo tanto se recomienda usar el equipo para el muestreo de microorganismos en aire en los cuartos limpios de la empresa Baxter Cartago.

## Recomendaciones

- Para los estudios de comparación y correlación se recomienda realizar dicho análisis en un cuarto experimental donde las condiciones ambientales puedan ser controlados por el investigador, ya que esto permite tener o aplicar una concentración de microorganismos conocida y evitar los cambios de aire que varíen las concentraciones de microorganismos en el mismo.

## BIBLIOGRAFIA

---

- ALUFFI L & REMBADO M. 2006. Contaminación Cruzada. <http://www.calidadalimentaria.net/cruzada2.php>.
- ARTIOLA J.; PEPPER I.; BRUSSEAU M. 2004. Environmental Monitoring and Characterization. Publicado por Academic Press. 410 p.
- BAXTER HEALTHCARE-UNITED STATES. 2008. <http://www.Baxter.com/>.
- BIOTEST. s.f. From Nature for life. RCS High Flow. Operating manual. 48 p.
- BIOTEST 2008. From Nature for life. The RCS High Flow Microbial Airborne Sampler. [http://www.gelaire.com.au/files/documents/Bulletin\\_High\\_Flow.pdf](http://www.gelaire.com.au/files/documents/Bulletin_High_Flow.pdf).
- BIOTEST HYCON. s.f. Standard RCS. Operating manual. 22 p.
- CARLBERG D. 1995. Cleanroom Microbiology for the Non-microbiologist. Interpharm/CR. 154 p.
- CARLETON J & AGALLOCO J. 1998. 2da edición Validation of Pharmaceutical Processes: Sterile Products. Informa Health Care, 840 p.
- COLE G. 1998. 2<sup>da</sup> edición Pharmaceutical Production Facilities: Design and Applications. Pharmaceutical technology. 334 p.
- COX C & WATHES C. 1995. Bioaerosols Handbook. Handbook of Samplers and Sampling. CRC Press. 247-250 p.
- CLONTZ L. 1997. Microbial limit and Bioburden Test. Validation Approaches and Global Requirement. CRC Pres. 240 p.
- DER F.; STABLEIN J.; COLEMAN D. 2005. Comparative evaluation of three active air sampler for the monitoring of airborne microorganisms. <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Testing/Comparative-Evaluation-of-threeActiveAirSampler/ArticleStandard/Article/detail/157787?contextCategoryId=40639&searchString=air%20samplers>.
- DE LA ROSA M.; MOSSO M.; ULLÁN C. 2002. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. Observatorio Medioambienta. Vol.5. 375-402 p.

DE LA CANAL M. 2007. Control de calidad: Buenas Prácticas de Manufactura: El eslabón inicial en la cadena de la calidad. <http://www.mundohelado.com/calidad/buenaspraticas.htm>.

ENAC. Entidad Nacional de Acreditación. 2007. Análisis microbiológicos. Documento aclaratorio sobre la validación de métodos NT-32 Rev 1. 9 p.

FDA. Food and Drug Administration. 2008. FDA's Mission Statement. <http://www.fda.gov/opacom/morechoices/mission.html>.

FEDERAL STANDARD 209E. 1992. Airborne Particulate Cleanliness Classes in Cleanrooms and Clean Zones Institute of Environmental Sciences. 48 p.

GIL F. 2005. Tratado de medicina del trabajo. Elsevier España. 366-367 p.

HORN J. 2005. Biotest. Comparison of Air Samplers for Environmental Monitoring regarding ISO 14698. Newsletter no. 65. 8 p.

HALLS N. 1994. Achieving Sterility in Medical and Pharmaceutical Products. Marcel Dekker, Inc. New York. Vol 64. 281 p.

ISO-8. 2008. Engineering design criteria requirements for facilities and manufacturing operations. 34 p.

JIMÉNEZ S & GONZALEZ R. s.f. Lavado de manos. Un punto crítico en la seguridad alimentaria. Revisión y comentarios. Universidad Nacional del Litoral. Centro de Publicaciones. 50 p.

METHA S.; MISHRA S.; PIERSON D. 1996. Evaluation of Three Portable Samplers for Monitoring Airborne Fungi. American Society for Microbiology. 62(5). 1835-1838p.

MONTERO V. 2007. Microbiología Industrial y Control de Calidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 176 p.

PEREZ M. 2008. QSR. Curso impartido por la empresa Baxter Cartago.

ROSAS I.; CRAVIOTO A.; EZCURRA E. 2004. Microbiología Ambiental. Programe S.A. Instituto Nacional de Ecología. 133 p.

RODRÍGUEZ S. 2005. "Validación Microbiológica del Proceso de Sanitización en el Área de Líquidos". UNIVERSIDAD DE CHILE Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica Instituto Sanitas S.A. Santiago, Chile.  
[http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/rodriguez\\_s/sources/rodriguez\\_s.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/rodriguez_s/sources/rodriguez_s.pdf)

SEMATECH D & MARTINICH P. 2001. Measurement Capability Analysis. Arizona: Intel Corporation. Rev.4.0.2. 240 p.

SENTÍS J.; COBO E.; PARDELL H.; CANELA J. 2003. 3<sup>da</sup> edición. Manual de Bioestadística. Publicado por Elsevier España. 337 p.

SHARP J & GOLDSTEIN R. 2002. Quality Rules in Medical Device Manufacture. Revised American Edición. Interpharm/ CRC. 80 p.

SWARBRICK J.; BOYLAN J. 2000. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Publicado por Informa Health Care. Vol 19. 500 p.

TÁVORA L.; GAMBALE W.; HEINS-VACCARI E.; ARRIAGADA G.; LACAZ C.; SANTOS C.; LEVIN A. 2003. Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 36 (5). 613-616 p.

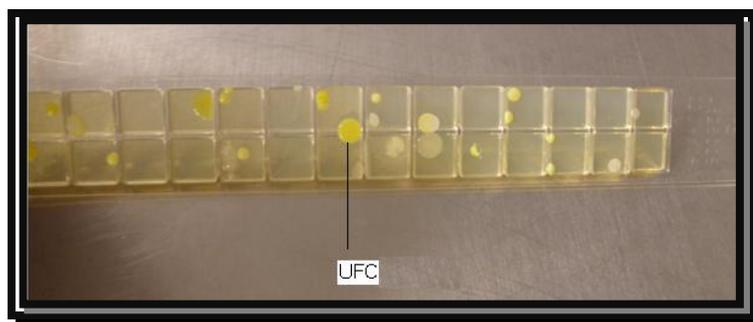
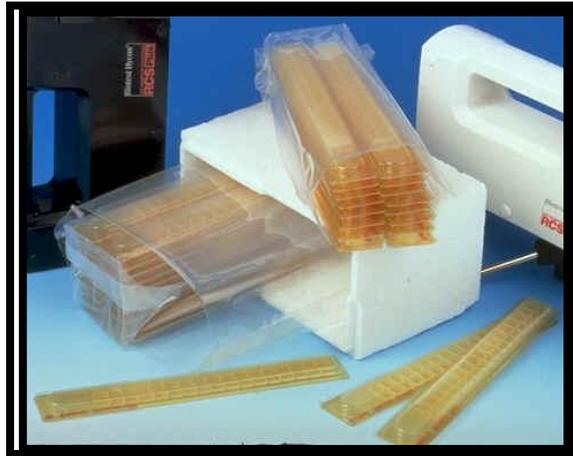
USP. United States Pharmacopeia .2007. VALIDATION OF ALTERNATIVE MICROBIOLOGICAL METHODS. 31(5) p1475.

WHYTE W. 2001. Cleanroom Technology: fundamentals of design, testing and operation. Wiley.309 p.

# ANEXOS

---

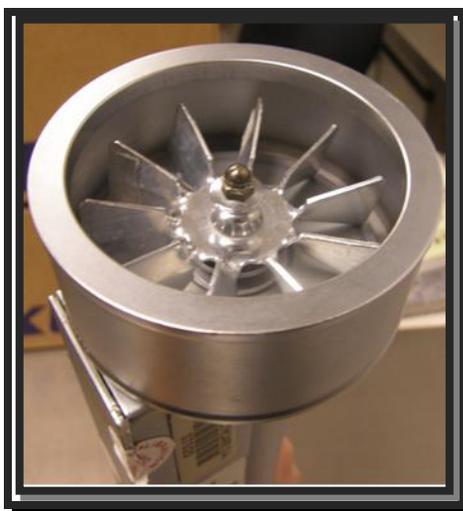
## Anexo 1. Tirillas de medio de cultivo para el equipo RCS.



## Anexo 2. RCS Standard

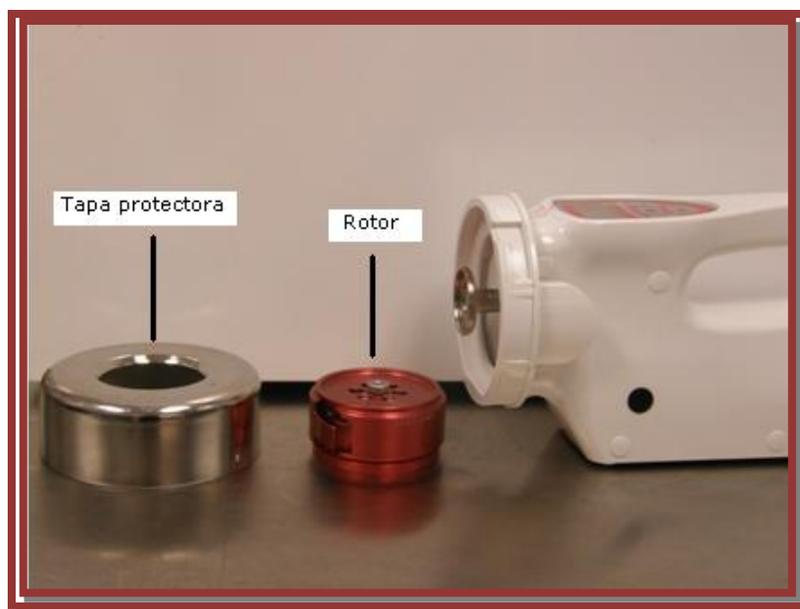


RCS Standard



Aspas del RCS Standard

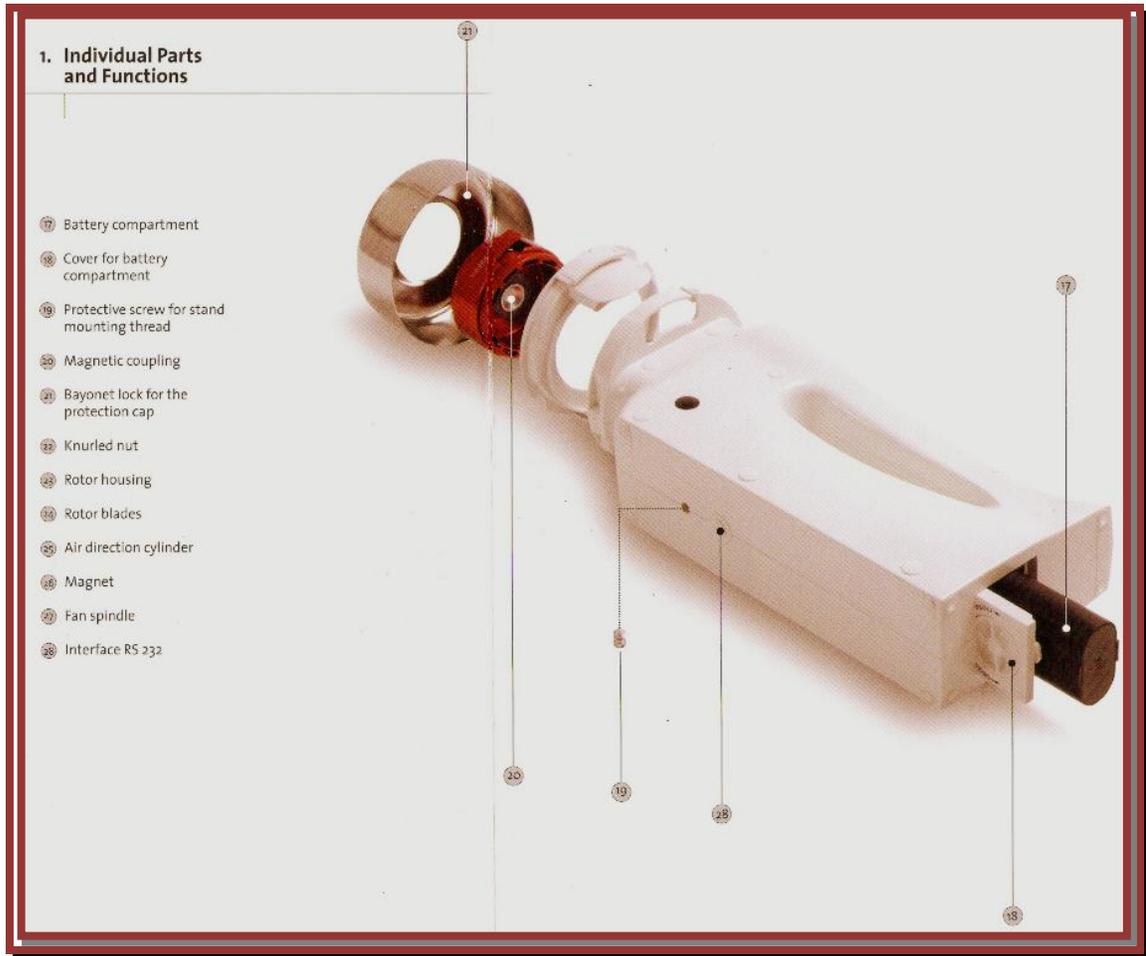
### Anexo 3. RCS High Flow



#### Anexo 4. Volúmenes de muestreo recomendados por el fabricante (Biotest)

Total count of microorganism expected in m <sup>3</sup> (CFU)	Pre-selected sample volume for RCS High Flow (Liters)	Number of expected colonies found on agar strip
0 to 10	1.000	0 to 10
10 to 200	500	5 to 100
200 to 500	200	40 to 100
500 to 1.000	100	50 to 100
1.000 to 2.500	50	50 to 125
2.500 to 10.000	20	50 to 200
10.000 to 20.000	10	100 to 200

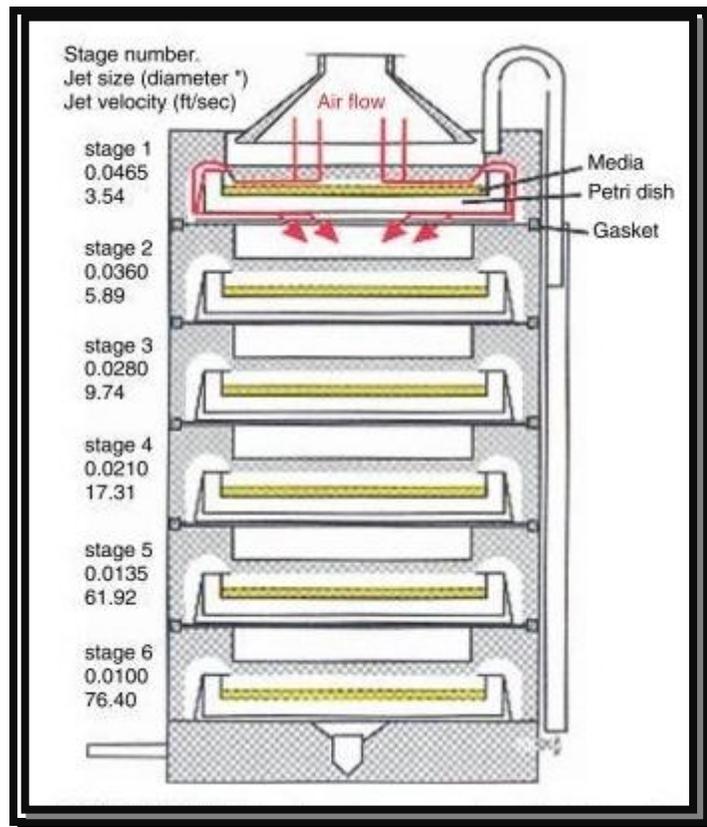
## Anexo 5. Partes del equipo RCS High Flow



## Anexo 6. Impacto



MAS-100

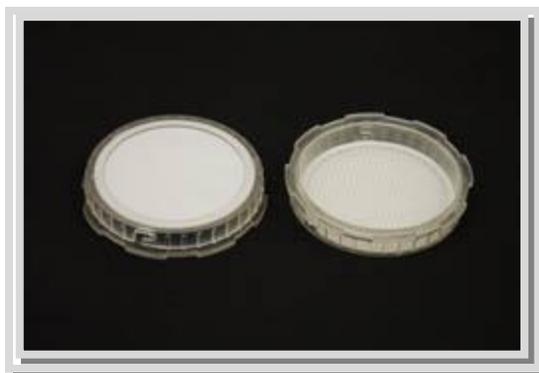


Andersen Six-Stage Impaction Air Sampler

## Anexo 7. Filtración

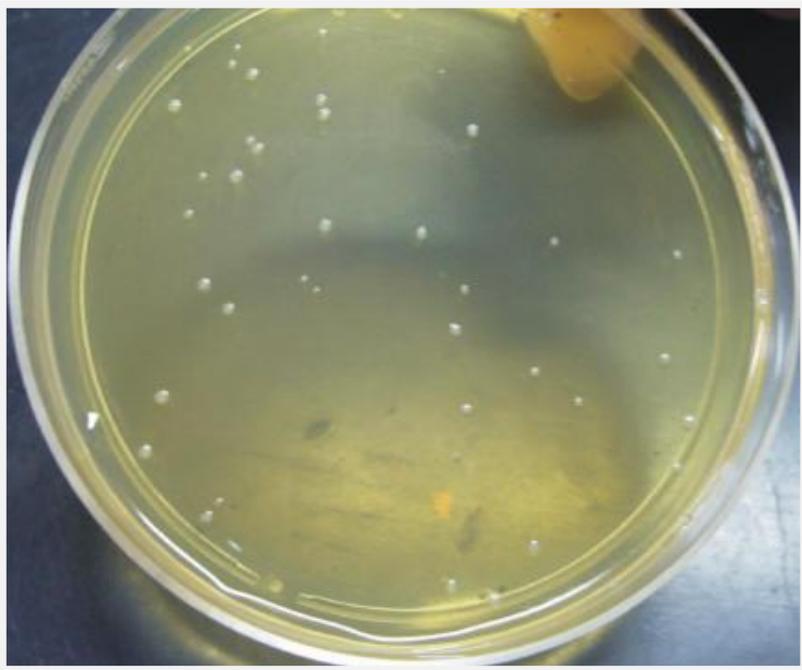


Filtración Satorius MD8 Air sampler

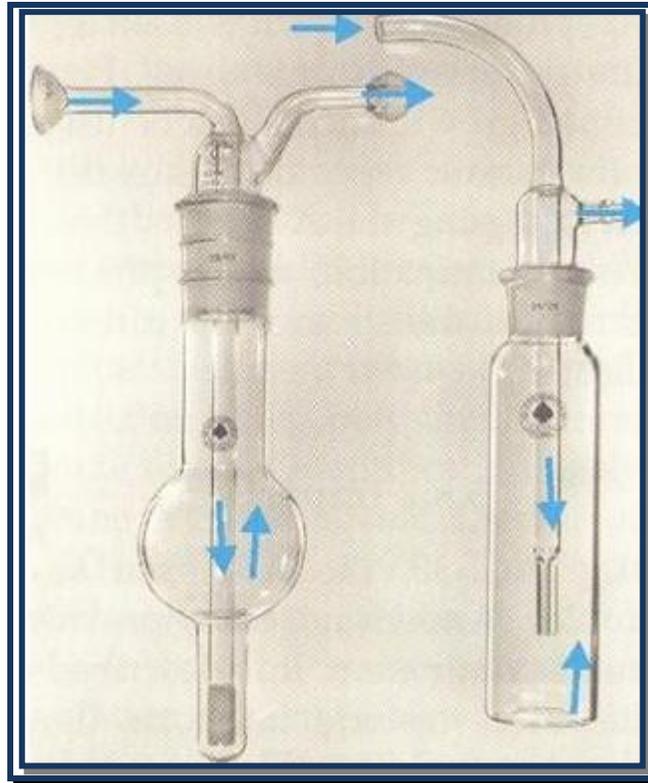


Gelatine Membrane Filter

## Anexo 8. Sedimentación



Anexo 9. Impinger



AGI-30 Impinger

## **Anexo 10. Hoja de información**

### **Información del estudiante:**

**Nombre:** Evelyn Solano Hernández

**Cédula:** 1- 1149- 990

**Carné ITCR:** 200017894

**Dirección de su residencia en época lectiva:** Agua caliente, Cartago.

**Dirección de su residencia en época no lectiva:** Agua Caliente, Cartago.

**Teléfono en época lectiva:** 88-31-44-46

**Teléfono época no lectiva:** 88-31-44-46

**Email:** [evelsolh23@gmail.com](mailto:evelsolh23@gmail.com)

### **Información del Proyecto:**

**Nombre del Proyecto:** Metodología para la validación del equipo RCS High Flow para monitoreo de microorganismos en aire ambiental.

**Profesor Asesor:** Ing. Olga Rivas Solano.

**Horario de trabajo del estudiante:** De lunes a viernes de 8 am a 4:30 pm.

### **Información de la Empresa:**

**Nombre:** Baxter Productos Médicos Ltda de Costa Rica.

**Dirección:** Parque industrial. Cartago.

**Teléfono:** 25-90-10-00

**Actividad Principal:** Producción de dispositivos médicos.