



Revista CENIC. Ciencias Químicas

ISSN: 1015-8553

juan.araujo@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones
Científicas
Cuba

Martín-Alfonso, Dayamí; Alfonso-González, Martha Julia; Fragas-Quintero, Anitza; Pérez-Guevara, María Teresa; Silva-Cabrera, Eladio

Evaluación de procesos de producción de componentes de los diagnosticadores
fabricados en Laboratorios DAVIH

Revista CENIC. Ciencias Químicas, vol. 46, 2015, pp. 7-13

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181643224023>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Evaluación de procesos de producción de componentes de los diagnosticadores fabricados en Laboratorios DAVIH

Dayamí Martín-Alfonso, Martha Julia Alfonso-González, Anitza Fragas-Quintero, María Teresa Pérez-Guevara, Eladio Silva-Cabrera.

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. San José de las Lajas, Mayabeque. cicdc@infomed.sld.cu

Recibido: 22 de julio de 2015. Aceptado: 8 de octubre de 2015.

Palabras clave: diagnosticadores, proceso de producción, validación de procesos.

Key words: diagnostic systems, manufacturing procedure, production process validation.

RESUMEN. La validación de los procesos de producción en la industria biofarmacéutica es uno de los principales requisitos para el aseguramiento de la calidad. En este trabajo se presentaron los resultados de la evaluación de las etapas críticas de la producción de componentes líquidos, liofilizados y polilaminados de los diagnosticadores fabricados en los Laboratorios DAVIH, desarrolladas en cuatro protocolos de trabajo en los cuales se evaluaron los procesos de esterilización de los materiales de envase, la filtración y envase de los componentes líquidos y la hermeticidad de los envases utilizados en la producción de componentes líquidos, liofilizados y polilaminados, utilizando metodologías de simulación específicas para cada uno de ellos. Resultaron operaciones válidas la esterilización y la hermeticidad de los envases para componentes líquidos y liofilizados y resultaron vulnerables las de filtración y envase de componentes líquidos, así como la hermeticidad de los polilaminados, la cual se substituyó por el doble cierre en las bolsas de polilaminado. Estos resultados representaron la primera evidencia documental de validación de tipo de producto terminado (diagnosticador) en nuestra institución.

ABSTRACT. The validation of manufacturing process is one of the principal requirements for the quality assurance, in biopharmaceutical industry. In this paper are shown the evaluation of the components production for diagnostic system that are produced in DAVIH Laboratories. The critical processes: the sterilization, lyophilization, preparation of liquid components and the tightness of the components packing were validated in four protocols using specific simulation methodologies for each one. The simulation proceedings revealed the main vulnerabilities in each operation. The sterilization and lyophilization were valid operations but the preparation of liquid components and the tightness of poly laminate component were critical operations. These results represent the first documental validation evidences in this type of product in DAVIH Laboratories.

INTRODUCCIÓN

Cualquier sistema o proceso que se encuentre orientado solo al control final de los resultados puede conllevar a que se detecten sus errores de forma tardía. Es por eso que en el actual enfoque de procesos se prioriza la prevención con un consecuente control del proceso y no del resultado como tal.¹

Desde el momento en que se diseña un diagnosticador, comienza el proceso de validación del mismo.² La seguridad de este no solo depende del cumplimiento de las especificaciones como producto terminado sino también de la calidad del proceso de fabricación del mismo.³ La simulación con medio de cultivo microbiológico es un método que

permite evaluar diversos parámetros como, por ejemplo, la vulnerabilidad de las operaciones y la habilidad para disminuir la contaminación microbiana.⁴

Las regulaciones vigentes en nuestro país respecto a la producción de los diagnosticadores establecen la obligatoriedad de evaluar las etapas críticas de los procesos productivos, atendiendo a la influencia que tienen sobre la calidad del producto terminado y sus componentes.^{5,6} Se han declarado como operaciones críticas a las operaciones de liofilización y las que involucren procesos esterilizantes incluyendo la filtración; las cuales se someten a validación, según lo establecido en la Regulación 5/94 del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED).⁵

Los diagnosticadores producidos en los Laboratorios DAVIH están basados en los principios inmunoenzimáticos del ELISA y de la inmunoelectrotransferencia. Los componentes que integran estos productos terminados son liofilizados, líquidos o polilaminados y en su elaboración se integran diversos procesos que en su mayoría son completamente manufacturados. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar las etapas críticas en los procesos de obtención de componentes (líquidos, liofilizados y polilaminados) de los diagnosticadores fabricados en los Laboratorios DAVIH.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en los sistemas de diagnóstico producidos en los Laboratorios DAVIH. (Tabla 1)

Tabla 1. Características de los sistemas de diagnóstico producidos en los Laboratorios DAVIH

Diagnostificador	Sistema	Tipo de componentes
DAVIH VIH-2	ELISA indirecto	Líquidos, polimalinado
DAVIH HTLV-I	ELISA indirecto	Líquidos, polimalinado
DAVIH AgP24	ELISA sandwich	Líquidos, liofilizado y polilaminado
DAVIH BLOT HTLV-I, BLOT VIH-2 unido y DAVIH BLOT	Western blott	Líquidos

Se realizó una revisión de los procesos de fabricación de cada tipo de componente de todos sistemas, teniendo en cuenta los documentos rectores de la producción y a partir del análisis de riesgos correspondiente, se seleccionaron los procesos a validar, teniendo en cuenta los aspectos regulatorios^{5,6} para lo cual se desarrollaron los siguientes protocolos:

Protocolo 1. Evaluación del proceso de esterilización de los materiales de envase para componentes líquidos

Preparación y control de esterilidad de medios de cultivo

Se prepararon y controlaron los medios de cultivo Caldo Triptona Soya (CTS) y Agar Triptona Soya (ATS) (*Oxoid*) según las instrucciones del fabricante.⁷

Simulación del proceso de esterilización

Se evaluaron tres retos del proceso de esterilización por calor húmedo (*Sakura*) con un régimen de tratamiento de 15 min a 121°C. Se incluyeron los controles químicos y biológicos (bulbos bioindicadores con esporas de *Bacillus stearothermophilus*) según las instrucciones de uso del fabricante.⁸ Se prepararon 24 microtubos de 1,5 mL (*Nalgene corp.*). En cada reto se incluyeron los controles, los viales y un tubo de 10 mL de CTS que posteriormente fue incubado a 56 °C por 48 h como control de esterilidad del proceso.

El caldo CTS se vertió a razón de 1 mL en los microtubos que se dividieron en grupos de seis y se incubaron a 22,5 ± 2,5°C y 35 ± 2,5 °C manteniendo un control visual por 10 d. Cuando a simple vista y con adecuada iluminación de los envases se evidenció la turbidez, sedimentos o costras en la superficie, se asumió el criterio de posible contaminación o crecimiento microbiano. Desde los caldos de los viales con el criterio anterior se realizó la siembra de 20 µL en dos placas de ATS, las cuales se incubaron a 22,5 ± 2,5°C y 35 ± 2,5°C y se observaron durante 10 d. Se realizó la identificación de colonias bajo el microscopio-estereoscopio y para la caracterización morfológica y microscópica de la célula bacteriana se realizó la tinción de Gram. Se realizaron los procedimientos de identificación de género y especie según se establece en el Manual de Bergeys (1994).⁹ Para la identificación de levaduras u hongos se utilizó también el procedimiento de identificación establecido en este Manual para estos microorganismos.⁹

Protocolo 2. Envase de componentes líquidos

Simulación del proceso de envase de componentes

Los envases que se emplearon en los componentes líquidos se identificaron con el siguiente código: A: microtubos, B: frascos de 30 mL y C: frascos de 60 mL.

Se prepararon 2 L de CTS sin esterilizar que se filtró en filtros comerciales (*Nalgene corp.*) de 0,2 μm . Se utilizó un filtro para cada tipo de envase (A, B y C) y dos como controles del proceso los que se incubaron a $22,5 \pm 2,5$ °C por 10 d. Se utilizaron 12 microtubos (previamente esterilizados), 12 frascos de 30 y 60 mL, que se abrieron en el gabinete de bioseguridad (de envase). Se procedió a envasar el medio CTS filtrado en cada variante, teniendo en cuenta las especificaciones y condiciones de operación de cada una de estas. Por cada variante simulada se dividieron dos grupos de seis envases que se incubaron a dos temperaturas: $22,5 \pm 2,5$ °C y $35 \pm 2,5$ °C hasta 10 d con observación diaria. Al finalizar la operación de envase, los frascos con medio líquido sobrante se cerraron y mantuvieron a temperatura de $22,5 \pm 2,5$ °C hasta el final de la evaluación del proceso. El cultivo e identificación de los microorganismos se realizó de acuerdo a como se describe en el protocolo 1.

Protocolo 3. Evaluación del proceso de liofilización de la proteína 24 del VIH-1 (antígeno liofilizado del sistema DAVIH- AgP24)

Simulación de la liofilización

Se prepararon y dispensaron 180 bulbos de vidrio de clase hidrolítica II como se describe a continuación: en 30 unidades, 0,5 mL de la solución de proteína (P24) del VIH-1, similar volumen de suero humano negativo a anticuerpos del virus de inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2), antígeno de superficie de la Hepatitis B y al virus de la Hepatitis C; 0,5 mL de disolución fisiológica y 0,5 mL de agua desionizada en las 60 unidades restantes.

Se realizaron tres ciclos de liofilización en una liofilizadora Edwards modelo EF-4 cargándose las cinco platinas del equipo con una disposición simétrica de todos los tipos de bulbos en la cámara del equipo. Una vez concluido el proceso se realizaron las siguientes comprobaciones:

- **Apariencia y reconstitución de la pastilla:** Se realizó por la observación en los bulbos de P24 liofilizada.
- **Determinación de la concentración de la proteína:** Se utilizaron las lecturas de densidad óptica en el sistema DAVIH AgP24, correspondientes a las concentraciones 514 y 16 pg/mL de P24 obtenidas a partir de los bulbos liofilizados, comparándose con un ensayo realizado en estas concentraciones a partir de la proteína sin liofilizar.
- **Humedad residual:** Por el método de Karl-Fisher utilizando los bulbos liofilizados con suero humano negativo como simulador de la formulación de la P24.¹⁰

En cada reto, se calcularon la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación intra e interplatinas y se compararon utilizando un procedimiento ANOVA con la prueba F de Fisher para la significación de medias y varianzas por punto y la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan para α 0,01.

Protocolo 4. Evaluación de la hermeticidad de los envases para los componentes líquidos, liofilizados y polilaminados

Se evaluó la hermeticidad de los envases de los componentes: bulbos de vidrio clase hidrolítica II, microtubos de 1,5 mL (*Nalgene*), frascos de 30 y 60 mL (*Nalgene*) así como el sistema: placa ELISA de 96 pozos (*Nunc corp.*)-bolsa de aluminio polilaminado (*PolyLabo corp.*).

La hermeticidad en los microtubos se evaluó mediante la técnica de inversión de los recipientes dispensados con disolución coloreada de azul de metileno, los cuales fueron dispuestos sobre papel de filtro.⁸ El criterio de hermeticidad se obtuvo siempre que no se observó ninguna marca de coloración en el papel de filtro lo cual es indicativo de que existe salida de líquido coloreado del interior del frasco que se encuentra invertido.

Para los frascos con rosca de 30 y 60 mL se utilizó una prueba de aplicación de presión a vacío en una cristalizadora con líquido coloreado en su interior, modificada con una manguera de entrada de presión y manómetro acoplado. La presión se aplicó hasta un diferencial de 50 mm de mercurio (Hg) durante un minuto. A los 10 min los frascos se sacaron y limpiaron por su exterior y el líquido del interior de cada envase se extrajo con una pipeta que se dispensó en tubos de ensayo; cada uno se comparó visualmente con una muestra no procesada en el equipo (control). La observación del contenido coloreado indicó la entrada de líquido al interior del frasco y por tanto que este no es un frasco hermético.⁷

En el polilaminado, se realizó el mismo procedimiento a 10 muestras de las placas ELISA selladas y 10 de estas con doble cierre (modelo TS 300), durante un minuto, a una presión de 380 mm de Hg. Para valorar la hermeticidad no se

debió observar burbujas antes de alcanzar la presión requerida ni la presencia de colorante en el interior de los sobres.⁷

En los bulbos de vidrio, se utilizaron las unidades liofilizadas con disolución fisiológica a las que se les aplicó una prueba de la hermeticidad descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos¹¹ para este tipo de envase, la cual se basa en la introducción de aire, con una jeringuilla, en el interior de los recipientes. Con la aguja sin retirar del tapón se introdujeron los bulbos en un recipiente con agua y se observó la entrada de agua al mismo, lo cual es indicativo del sellado del recipiente al vacío.³

Este procedimiento se repitió a los seis meses de haberse realizado las corridas de liofilización conforme a lo planteado para este tipo de producto.³

Criterio de aceptación general de operación

La operación fue válida cuando en ningún reto existieron evidencias de crecimiento microbiano o hermeticidad fue del 100 %.

La operación fue vulnerable cuando en uno de los retos se obtuvo evidencias de crecimiento microbiano o indicios de no hermeticidad en menos del 80 % de las muestras estudiadas para ambos criterios. La operación fue muy vulnerable cuando en uno de los retos se superó este criterio por encima del 80 % o se observó el crecimiento en todos los retos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Protocolo 1. Evaluación del proceso de esterilización en autoclave de los materiales de envase

Los controles físicos y biológicos indicaron que el proceso de esterilización fue satisfactorio en cada una de las corridas. En el estudio microbiológico, con el uso del medio de cultivo simulador CTS incubado en el rango de temperatura donde se desarrollan los contaminantes ambientales microbianos (bacterias, hongos o levaduras); no se observó indicio de este crecimiento en ninguna de las tres corridas que se realizaron, por lo cual se comprobó la validez de los tres procesos de esterilización realizados. En la garantía de la calidad, las Buenas Prácticas de Producción (BPP) constituyen los elementos que aseguran que los productos se fabriquen de manera uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad y conforme a los requisitos especificados para su producción y comercialización.

Protocolo 2. Envase de componentes líquidos

Los resultados de la simulación de la sub-etapa de filtrado esterilizante de componentes líquidos, se observó crecimiento de *Bacillus sp* en el filtro incubado a 25 °C y de *Micrococcus sp* en un filtro de la variante A, en uno de los tres retos efectuados. Se consideró que el crecimiento microbiano observado se debe fundamentalmente a fallos en la manipulación del filtro, una inadecuada práctica de limpieza y de desinfección de los elementos que ingresaron al área de envase debido a que los microorganismos de estos géneros pueden ser transportados por el aire.¹² Este resultado indicó una vulnerabilidad en el procedimiento de esta sub-etapa del proceso de envase. (Tabla 2)

Tabla 2. Resultados de la simulación de la etapa de filtrado de componentes líquidos

Variante de filtro	Correspondiente al envase de	Corridas		
		1	2	3
		Crecimiento Microbiano		
	Filtro Control (22,5 ± 2,5 °C)	-	<i>Bacillus</i>	-
	Filtro Control (35 ± 2,5 °C)	-	-	-
A	Filtro para Microtubos	<i>Micrococcus</i>	-	-
B	Filtro para Frascos 30 mL	-	-	-
C	Filtro para Frascos 60 mL	-	-	-

Los resultados del estudio microbiológico de la simulación de la sub-etapa de envase que se realizó posterior a la filtración de los componentes líquidos, donde se observaron crecimiento microbiano en las variantes A y B, en una de las tres corridas. En ambas se identificaron microorganismos de los géneros *Micrococcus* y *Bacillus*, comunes en la práctica microbiológica y ambientes limpios.^{13,4} (Tabla 3)

El reto 1 de la filtración fue coincidente en el crecimiento de *Micrococcus* sp. con respecto al del envase en la variante A, sin embargo, los resultados muestran que ambos eventos son diferentes, pues para poder afirmar que se encuentran relacionados, al menos todas las unidades en la variante incubadas a $35 \pm 2,5$ °C tienen que mostrar crecimiento. La contaminación microbiana en los procesos de producción es causada principalmente por el personal y más del 99 % de todos los microorganismos detectados en cuartos limpios son introducidos por el personal que labora en ellos.¹³ En esta simulación solo resultaron válidos los tres retos de la variante C del envase. La operación de envase fue evaluada como vulnerable incluyendo la filtración como paso más vulnerable en variantes A de envase, así como en la variante B para la cual esta operación se evaluó como "muy vulnerable" ya que se observó crecimiento bacteriano en los tres retos realizados y el filtro del cual se partió no contenía ningún indicio de crecimiento anterior. El hecho de que los componentes líquidos de los diagnosticadores DAVIH estén declarados en sus especificaciones de calidad como componentes con calidad microbiológica no controladas permite la convivencia con los indicadores del riesgo evaluados en ambas sub-etapas de la operación de envase.

Tabla 3. Evaluación de la simulación de la etapa de envase

Reto	1				2				3			
TI	$22,5 \pm 2,5$ °C				$35 \pm 2,5$ °C				$22,5 \pm 2,5$ °C			
ENVASE	EC	I	EC	I	EC	I	EC	I	EC	I	EC	I
A: Microtubos (n=12)	0	-	1	<i>Micrococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
B: Frascos 30 mL (n=6)	3	<i>Bacillus</i>	3	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
C: Frascos 60mL(n=6)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TI: Temperatura de incubación; n: cantidad de envases estudiados; EC: Envase con crecimiento microbiano, I: Identificación taxonómica de las colonias.

Pese a que las reglamentaciones que rigen las BPP tienen como objeto principal disminuir los riesgos en toda producción farmacéutica inherentes a la contaminación cruzada y a los errores de manipulación, estos no pueden prevenirse completamente mediante el control definitivo de los productos pues las pruebas de control de calidad después de la fabricación no son una garantía suficiente. Por lo tanto, resulta imprescindible evaluar la vulnerabilidad de cada práctica, así como los elementos que pudieran aportar más a la reducción del riesgo en las mismas.¹²

Protocolo 3. Evaluación del proceso de liofilización de la proteína 24 del VIH-1 (antígeno liofilizado del sistema DAVIH-AgP24)

Apariencia y reconstitución: El producto P24 liofilizado es una masa porosa y seca, homogénea, de color blanco que se reconstituye en cuatro segundos como promedio.

Concentración de P24: No existieron diferencias significativas en el test de Duncan en los ensayos intraplatinas en ninguno de los tres ciclos de liofilización, aceptándose todos los ensayos como válidos (Tabla 4). El coeficiente de variación en ambas concentraciones probadas no excedió el 20 %, límite aceptable para este tipo de ensayos. El análisis estadístico mostró que los tres ciclos fueron homogéneos y cuando se realizó la comparación con el ensayo realizado a partir de la P24 sin liofilizar, la integridad de la proteína P24 no se afectó con el procedimiento de liofilización utilizado (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación del proceso de liofilización del componente liofilizado (P24)

Platinas*	Medias de la densidad óptica (intraplatinas) en dos concentraciones de la curva patrón de la P24					
	Concentración 514 pg/mL			Concentración 16 pg/mL		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
P1	2,37a	2,98a	2,95ab	0,206b	0,368bc	0,383a
P2	2,42 a	2,98a	2,97a	0,22 ab	0,344c	0,351a
P3	2,42 a	2,96a	2,918b	0,225ab	0,41 ab	0,361a
P4	2,44 a	2,96a	2,92b	0,23ab	0,399 ab	0,346a
P5	2,45 a	2,97a	2,979a	0,283a	0,423 a	0,401a
P24 sin liofilizar	2,43	2,99	2,97	0,165	0,446	0,404
Parámetros estadísticos	Comparación de la media interplatinas (P24 liofilizada) y la proteína sin liofilizar					

X	2,42	2,97	2,95	0,212	0,397	0,374
DE	0,03	0,012	0,02	0,024	0,035	0,035
CV (%)	1,27	0,4	0,9	11,6	8,97	6,75

Platinas 1 a la 5: P1, P2, P3, P4, P5

*Test Anova: $F_{514pg/mL}$: F(I)=1,00; F(II)=1,83;F(III)=7,48

$F_{16pg/mL}$: F(I)=3,74; F(II)=8,9;F(III)=1,62

Test de Duncan: Letras diferentes, difieren significativamente

Humedad residual: En la determinación de la humedad residual se obtuvieron porcentos menores del 5 % en todas las posiciones de la platina. Para los tres ciclos se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 20 % (Tabla 5). Con estos resultados se validaron los tres ciclos de liofilización de la proteína P24, que es el único componente liofilizado en los diagnosticadores producidos en Laboratorios DAVIH.

Tabla 5. Evaluación de la humedad residual por el método de Karl Fisher en el proceso de liofilización de la P24

	Corridas o ciclos de liofilización								
	Ciclo 1			Ciclo 2			Ciclo 3		
	X	DE	CV	X	DE	CV	X	DE	CV
P1	4,239 _a	0,109	2,57	2,248 _a	0,306	13,61	4,138 _a	0,279	6,74
P2	4,14 _a	0,199	4,8	2,102 _a	0,31	12,77	4,344 _a	0,206	4,74
P3	4,45 _a	0,333	7,46	2,62 _a	0,307	11,71	3,58 _a	0,321	7,34
P4	3,512 _b	0,501	14,1	2,03 _a	0,352	17,27	4,287 _a	0,322	7,51
P5	3,34 _b	0,348	10,41	2,23 _a	0,409	19	4,55 _a	0,183	4,02
interplatinas	3,93	0,483	12,29	2,24	0,227	10,10	4,18	0,366	8,75

X:media; DE: desviación estándar; CV:coeficiente de variación

*Test Anova: F(I)=11,85; F(II)=1,57;F(III)=0,35

Test de Duncan: Letras diferentes, difieren significativamente

Protocolo 4. Evaluación de la hermeticidad de las formas de presentación utilizadas en la producción de diagnosticadores DAVIH

Se constató que tanto los viales, los bulbos como los frascos con rosca utilizados como envase de componentes de los diagnosticadores DAVIH fueron herméticos en el 100 % de las unidades probadas. En los bulbos se mantuvo la hermeticidad por 6 meses después de la primera comprobación, conforme a lo establecido para los productos biotecnológicos liofilizados¹⁴ mientras que las bolsas de polilaminado con cierre simple no fueron herméticas en ningún caso. En el caso de las que se le aplicó el doble cierre, el 100 % fueron herméticas, por lo que todas las operaciones de hermeticidad resultaron válidas con excepción de las de los polilaminados con cierre simple proponiéndose la sustitución por el doble cierre, dentro del proceso tecnológico establecido en la producción de este componente.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en los diversos protocolos desarrollados se concluyó que las operaciones que resultaron válidas fueron la esterilización y la hermeticidad de los envases para componentes líquidos y liofilizados y las operaciones vulnerables fueron las de filtración y envase de componentes líquidos, así como la hermeticidad de los polilaminados, la cual se sustituyó por un doble cierre en las bolsas polilaminadas. Estos resultados representaron la primera evidencia documental de validación de tipo de producto terminado (diagnosticador), los cuales son producidos en nuestra institución, el Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC) con el sello comercial DAVIH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Curso de gestión de calidad y buenas prácticas de laboratorio. Documentos técnicos: políticas y regulaciones THR-HT-2009/01. Módulo 7: Gestión y control de procesos. Edición II. Whashington DC. 2009. ISBN 979-92-95-32977-1.
2. Ochoa R. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. Sección I. estandarización y validación de técnicas inmunoenzimáticas. Ediciones Finlay. La Habana. Cuba. 2013. ISBN 978-959-7076-50-6.
3. Kelley BD, Jakubik J, Vicik S. Viral clearance studies on new and used chromatography resins: Critical review of a large dataset. *Biologicals*. 2007; 35:1-11.

4. Escarp A, Fontanet L, Saavedra L, Obaya MM, Hernández M, González, M. Validación de los procesos de formulación y llenado aséptico en la producción del Instituto Finlay. III Taller de Procesos Asépticos en la Industria biofarmacéutica (CD ROM) 2005. ISBN 224-112-1716-30-2.
5. Regulación No 5-1994: Principios generales de la validación de procesos en la Industria Farmacéutica. Centro para el Control de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), Ciudad de la Habana, Cuba, 1994. Consultado:13 de Noviembre de 2014 Disponible en: <http://www.cecmmed.sld.cu>.
6. Regulación 20-2004: Buenas prácticas de fabricación para los diagnosticadores. Centro para el Control de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), Ciudad de la Habana, Cuba, 2004. Consultado:13 de Noviembre de 2014. Disponible en <http://www.cecmmed.sld.cu>.
7. World Health Organization (WHO). The International Pharmacopoeia: Methods of analysis. 4ta Ed, vol. 2, suplemento 1. 2008. Consultado: 18 de Abril de 2015. Disponible en <http://www.who.int/phint>
8. The United States Pharmacopeial Convention. The official compendia of standards (USP). Validación de métodos farmacopeicos, 32 ed. USA: Rockville: Mack Printing United States Pharmacopeia Convention Inc: 2009: p749-3331.
9. Holt JG, Kneg NR, Sneath, PHA, Stanley J, Williams ST. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed, 1994:p.334-339.
10. Ivanova P, Aneva Z. Assesment and assurance of quality in water measurement by coulometric Karl Fisher titration of petroleum products. Accred Qual Assur. 2006;10:543-549.
11. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). MGA Prueba de sellados para frascos con productos liofilizados y sellados al vacío. 1988:p2345-2346.
12. Fernández C, Moreno D, Arias J, Granados JM. Metodología para la validación del llenado aséptico en un proceso de liofilización. Rev Cub Farm. 2007; 41(1):11-13.
13. Agalloco J, Akers J. Aseptic processing: A vision of the future. Pharm Tech. 2005; 2(2):12-19.
14. Jinsong L, Todd V, Marlin V, Mitch A, Paresh D. A study of the impact of freezing on liophilization of concentrated formulation with a high fill depth. Pharm Dev Tech. 2005; 10:261-272.