



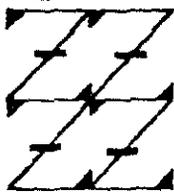
63
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EVALUACION MICROBIOLOGICA DE LOS
PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y SANITIZACION
DE LOS EQUIPOS DEL AREA DE FABRICACION
DE LIQUIDOS.**

**PROYECTO TERMINAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SILVIA SANCHEZ ISIDORO**

**UNAM
FES
ZARAGOZA**



**LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION**

MEXICO, D.F.

2001

EST. FEBRERO 2001
SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
SECRETARIA DE SALUD



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MTR. JUAN FRANCISCO SANCHEZ RUIZ
DIRECTOR DE LA FES ZARAGOZA
P R E S E N T E

Distinguido Sr. Director

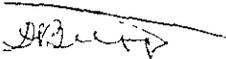
Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la)
Alumno(a) SILVIA SÁNCHEZ ISIDORO

denominada Evaluación microbiológica de los procedimientos de
limpieza y sanitización de los equipos del área de fabricación
de líquidos.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo el VOTO DE
ACEPTACIÓN, ya que reúne los requisitos establecidos por la Legislación
Universitaria. Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido (a) en el
Jurado del Examen Profesional que sustentará dicho alumno

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y
distinguida consideración

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
México, D.F. de de 20


O.F.F. DOMITILA BURGOS JARA
PRESIDENTE



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

FEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MTRO. JUAN FRANCISCO SANCHEZ RUIZ
DIRECTOR DE LA FES ZARAGOZA
P R E S E N T E

Distinguido Sr. Director:

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la)
Alumno(a) SILVIA SÁNCHEZ ISIDORO

denominada: Evaluación microbiológica de los procedimientos de
limpieza y sanitización de los equipos del área de fabricación
de líquidos.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo el VOTO DE
ACEPTACIÓN, ya que reúne los requisitos establecidos por la Legislación
Universitaria. Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido (a) en el
Jurado del Examen Profesional que sustentará dicho alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y
distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
México D.F. de de 20

O. F. B. RAMÓN RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ
VOCAL.



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MTRO. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ
DIRECTOR DE LA FES ZARAGOZA
P R E S E N T E

Distinguido Sr. Director :

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la)
Alumno(a) SILVIA SÁNCHEZ ISIDORO

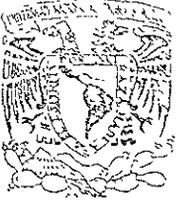
denominada: Evaluación microbiológica de los procedimientos de
limpieza y sanitización de los equipos del área de fabricación
de líquidos.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo el VOTO DE
ACEPTACIÓN, ya que reúne los requisitos establecidos por la Legislación
Universitaria. Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido (a) en el
Jurado del Examen Profesional que sustentará dicho alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y
distinguida consideración

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
México, D.F. de de 20

Q. F. B. 
ALFREDO MORA GUEVARA
SECRETARIO



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

FEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MTRO JUAN FRANCISCO SANCHEZ RUIZ.
DIRECTOR DE LA FES ZARAGOZA
PRESENTE

Distinguido Sr. Director

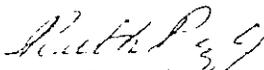
Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la)
Alumno(a) SILVIA SÁNCHEZ ISIDORO

denominada Evaluación microbiológica de los procedimientos de
limpieza y sanitización de los equipos del área de fabricación
de líquidos.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo el VOTO DE
ACEPTACIÓN, ya que reúne los requisitos establecidos por la Legislación
Universitaria. Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido (a) en el
Jurado del Examen Profesional que sustentará dicho alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y
distinguida consideración

A F E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
México, D.F. de de 20


O.B.P. RUTH PAZ GONZÁLEZ
SUPLENTE



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MTRO. JUÁN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ,
DIRECTOR DE LA FES ZARAGOZA
P R E S E N T E .

Distinguido Sr. Director :

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (a)
Alumno(a) SILVIA SÁNCHEZ ISIDORO.

denominada: Evaluación microbiológica de los procedimientos de
limpieza y sanitización de los equipos del área de fabricación
de líquidos.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo el VOTO DE
ACEPTACIÓN, ya que reúne los requisitos establecidos por la Legislación
Universitaria. Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido (a) en el
Jurado del Examen Profesional que sustentará dicho alumno.

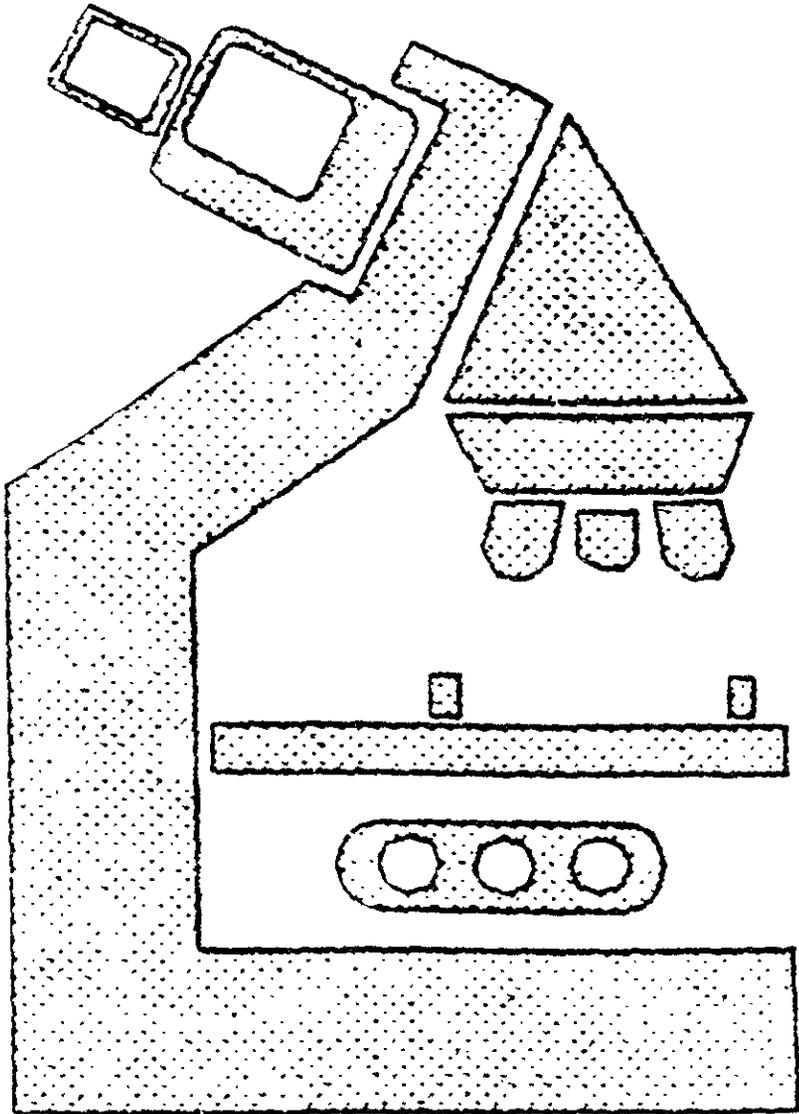
Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y
distinguida consideración.

ATENTAMENTE

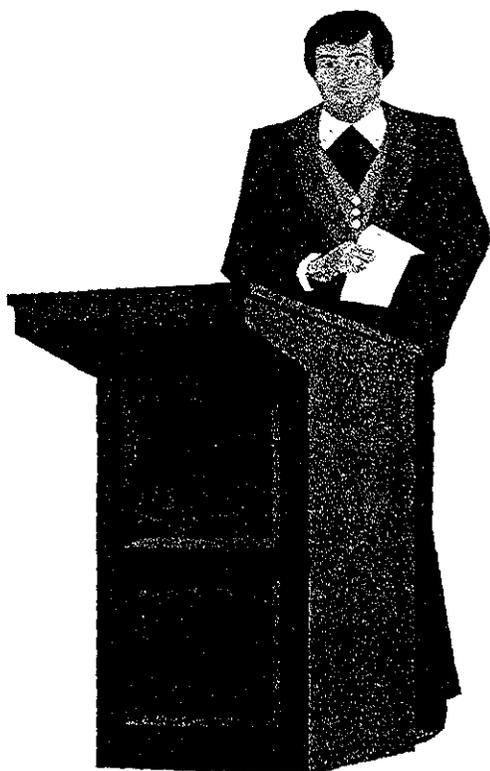
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

México, D.F., de _____ de 20__

Q.F.I. MARTHA MARTÍNEZ ROJAS.
SUPLENTE



“AGRADECIMIENTOS”



A DIOS

Por que me dio la fuerza para salir adelante en todo momento y ante cualquier circunstancia y darme la oportunidad de dedicar esta meta a mis padres y hermanos; demostrándoles que su esfuerzo y dedicación han dado frutos.

A MAMA

Por que desde el lugar que se encuentre al lado de Dios, a estado con migo, me ha cuidado y protegido. Por que las primeras enseñanzas de la vida y los valores humanos que sembraste en mí y por todo tu esfuerzo que desempeñabas para crecer cada día más al lado de mi Padre; han logrado que fueras mi más grande ejemplo y lograr llegar a este momento.

TE AMO.

A TI PAPÁ

Por todo el amor y cariño que me has brindado y por que siempre te has esforzado para que nunca me faltara salud, alimento, educación y vestido. Por haberme guiado e impulsado a ser una mujer de bien, gracias a tus consejos y tu ejemplo. Por que en todo momento bueno o malo siempre has estado a mi lado y por que gracias a ti, he tenido la fortaleza y dedicación llegar hasta donde me encuentro hoy.

TE AMO. ¡Eres el mejor papá del mundo!

A MIS HERMANOS

Por estar siempre conmigo, apoyándome en todo momento que lo he necesitado y hacer notar mis errores y virtudes; por que juntos formamos una familia, en la cuál hemos compartido durante la niñez y adolescencia tristezas pero también grandes alegrías y éxitos de metas forjadas y sueños anhelados.

LOS QUIERO MUCHO. ¡Gracias por estar con migo!

DOLORES: Sé que donde quiera que este, también comparte mi anhelo.

¡Siempre vivirás en mí!

ISAAC y J. DAVID

Por regalarme día con día su amor, alegría y su pureza de niños; deseando de todo corazón que este proyecto sea un ejemplo de dedicación, esfuerzo y anhelos de superación.

LOS AMO. ¡Siempre cuentan con migo!

TI GUSTAVO

Por brindarme tu amor, por disfrutar con migo muchas alegrías y por nunca dejarme sola en las situaciones difíciles de mi vida. También te agradezco por formar parte de esta cadena de personas que de una forma a otra me impulsaron y ayudaron a lograr esta meta

TE QUIERO MUCHO. ¡Gracias por ser parte de mí!

A Q.F.B. RAMÓN RODRÍGUEZ

Por darme la oportunidad y confianza para desarrollar este proyecto, por que Ud. fue una pieza muy fundamental en este logro.

¡Mil gracias por todo!

A Q.F.I MARTHA MARTÍNEZ

Por asesorarme en el proyecto y compartir sus conocimientos con migo; por el apoyo en las situaciones difíciles, las palabras de aliento, consejos y oportunidades que me brindo; y sobre todo por su Amistad y Cariño.

¡Nunca lo olvidare!

A Q.B.P. RUTH PAZ

Por todo el apoyo incondicional y todas las facilidades que me brindo para terminar con el proyecto. Por sus enseñanzas y cariño.

¡Permanecerá por siempre en mí corazón!

A QUIMICA PATRICIA LÓPEZ

Por facilitarme el material, equipo y área de trabajo para la realización del proyecto.

A LOS SINODALES

Por el tiempo dedicado al proyecto y a mí, para lograr este sueño anhelado.

¡¡Mil Gracias!!

A MI PADRE:



A quien me a heredado el tesoro más valioso que puede darse a un hijo "AMOR".

A quien sin escatimar esfuerzo alguno a sacrificado en gran parte de su vida para formarme y educarme

A quien la ilusión de su existencia a sido convertirme en persona de provecho.

A quien nunca podré pagar todos sus desvelos, ni aun con las riquezas más grandes del mundo.

Por todo eso y más ...

GRACIAS.

Y agradezco infinitamente a todas aquellas personas que de alguna manera u otra han estado apoyándome o intervinieron en esta meta.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

Silvia Sánchez Isidoro

Nº de Cuenta: 9552921-5

Carrera: "Químico Farmacéutico Biólogo"

Orientación: Bioquímica Clínica.

Año de termino de la carrera: 1998.

**Título del Proyecto: Evaluación microbiológica
de los procedimientos de limpieza y sanitización
de los equipos del área de fabricación de líquidos.**

Área específica del proyecto: Microbiología y Producción

Director de tesis: Q.F.B. Ramón Rodríguez Hernández

Asesor de tesis: Q.F.I. Martha Martínez Rojas

Lugar de desarrollo del trabajo: Laboratorio Farmacéutico.

México D.F. 2001.

INDICE.

I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

1. Regulación de la limpieza.
2. Definición de limpieza.
 - 2.1 Mecanismos básicos.
 - 2.1.1 Acción mecánica.
 - 2.1.2 Disolución.
 - 2.1.3 Detergencia.
 - 2.1.4 Reacciones químicas.
 - 2.2 Requisitos para una limpieza eficiente.
3. Definición de sanitización.
 - 3.1 Selección de un sanitizante.
 - 3.2 Características de un agente químico.
 - 3.3 Factores que afectan la eficacia de los sanitizantes.
 - 3.4 Tipo de agentes químicos antimicrobianos.
 - 3.4.1 Clasificación.
 - 3.4.1.a Características.
 - 3.4.1.b Mecanismo de acción.
4. Características morfológicas (micro y macroscópicas), patogenicidad e identificación de los microorganismos utilizados en la metodología.
 - 4.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
 - 4.2 *Bacillus subtilis*. ATCC 6633
 - 4.3 *Enterobacter cloacae*. ATCC 13047
 - 4.4 *Escherichia coli*. ATCC 10536
 - 4.5
 - 4.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*. ATCC 35032
 - 4.5.2 *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* ATCC 25416

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

III. OBJETIVOS.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

V. MÉTODO GENERAL (DIAGRAMA DE FLUJO).

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

1.

- 1.1 Material.
- 1.2 Equipo.
- 1.3 Soluciones.
- 1.4 Cepas.
- 1.5 Medios de cultivo.

2. Metodología.

- 2.1 Recopilación retrospectiva del análisis microbiológico realizado en:
 - A. Los productos del área de líquidos no estériles a granel ó terminado.
 - B. El agua de sanitización de tuberías de llenado.
 - C. La verificación de la limpieza y sanitización de los equipos.
- 2.2 Prueba de la efectividad del sanitizante.
 - 2.3.1 Enriquecimiento de cepas.
 - 2.3.2 Dilución de cepas.
 - 2.3.3 Método.
- 2.3 Verificación del recobro microbiano.
 - 2.3.1 Enriquecimiento de cepas.
 - 2.3.2 Dilución de cepas.
 - 2.3.3 Método.
- 2.4 Efectividad del sanitizante in - vitro.
 - 2.3.1 Enriquecimiento de las cepas.
 - 2.3.2 Dilución de cepas.
 - 2.3.3 Método.

VII. RESULTADOS.

- 1. Recopilación retrospectiva de los análisis microbiológicos realizados en:
 - A. Producto (no estéril) a granel y terminado.
 - B. En el agua de sanitización de tuberías de llenado.
 - C. En la verificación de la limpieza y sanitización de los equipos.
- 2. Efectividad del sanitizante.
- 3. Verificación del recobro microbiano.
- 4. Efectividad del sanitizante in - vitro.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

1. Recopilación retrospectiva de los análisis microbiológicos realizados en:
 - A. Producto (no estéril) a granel y terminado.
 - B. En el agua de sanitización de tuberías de llenado.
 - C. En la verificación de la limpieza y sanitización de los equipos.
2. Efectividad del sanitizante.
3. Verificación del recobro microbiano.
4. Efectividad del sanitizante in vitro.

IX. CONCLUSIÓN.

X. PROPUESTA DE UN ROLL DE SANITIZANTES.

XI. RECOMENDACIONES.

XII. ANEXO I.

XIII. ANEXO II.

XIV. ANEXO III.

XV. ANEXO IV.

XVI. ANEXO V.

XVII. ANEXO VI.

XVIII. ANEXO VII.

XIX. ANEXO VIII.

XX. ANEXO IX.

XXI. BIBLIOGRAFÍA.

FUNDAMENTACION TEORICA.

Regulación de la Limpieza para la Industria Farmacéutica.

En los últimos años; la industria farmacéutica ha tenido mayor interés en los procedimientos de limpieza, utilizados en la fabricación de medicamentos, para que éstos sean cada vez más eficientes, y cumplan con el objetivo de remover principios activos, excipientes, microorganismos y residuos de los agentes de limpieza.

Para asegurar que los procedimientos de limpieza no ponen en riesgo la calidad, seguridad, identidad, pureza o potencia de los productos, la FDA (Food Drug Administration) y la Secretaria de Salud (SS) recomiendan que éstos detallen la forma en que va a realizarse la limpieza, los cuales deberán estar documentados en PNO's (Procedimientos Normalizados de Operación) que demuestren que no están poniendo en riesgo el producto fabricado ³⁰.

El requerimiento de equipos limpios previos a ser utilizados en la fabricación de medicamentos no es nada nuevo, las regulaciones de la FDA específicamente en las GMP's (Good Manufactory Practice) 1963 (parte 133.4), explican que: " El equipo debe mantenerse limpio y ordenado". En el CFR (Code Federal Regulation) título 21 (211.67) menciona: " Los equipos y utensilios deben estar limpios y sanitizados a intervalos apropiados, y contar con un programa de mantenimiento que evite que un mal funcionamiento sea una posible contaminación, y así de esta manera demostrar que no se pone en riesgo la calidad, seguridad, identidad, potencia y pureza de los productos" ¹⁵.

Los procesos básicos de desinfección de los equipos para la prevención de contaminantes por microorganismos en los productos; consta de 2 pasos:

- Limpieza
- Sanitización

Limpieza: El procedimiento de limpieza consiste en la remoción de las impurezas y contaminantes de la superficie de los equipos, eliminando los substratos como tierra, residuos, suciedad, polvo, grasa u otras materias objetables que pueden favorecer el crecimiento de microorganismos o provocar una inactivación parcial del sanitizante ⁸.

2.1 Mecanismos básicos de la limpieza.

Existen cuatro mecanismos para la remoción de los residuos:

2.1.1 Acción mecánica. Es referida a cualquier variedad de procesos no químicos, incluyendo el cepillado y el movimiento de arrastre del agua (hidrolavadora, agua de alta presión), hasta la nueva tecnología como la del uso de hilo seco para la remoción mecánica.

2.1.2 Disolución. La disolución implica disgregar el residuo con un disolvente orgánico o con agua, en algunos casos, la disolución puede lograrse utilizando aditivos, como algunos residuos ácidos, que pueden ser más solubles en agentes de limpieza alcalinos, y algunos residuos alcalinos pueden ser más solubles en limpiadores acuosos ácidos.

2.1.3 Detergencia. El significado de la detergencia se refiere al uso de surfactantes en sistemas acuosos.

El surfactante equilibra por si mismo la interfase entre el agua y el residuo, ya sea humectando, emulsificando y/o dispersando.

Humectar se refiere al proceso mediante el cual el agua desplaza el aire existente en la superficie del residuo; emulsificar es referido al proceso en el cual se forman las llamadas micelas, y la Dispersión se refiere a la propiedad del detergente a mantener el residuo suspendido en una disolución acuosa.

1.4 Reacciones químicas. El cuarto mecanismo de limpieza involucra reacciones químicas, en las cuales la naturaleza química del residuo es cambiada, rompiendo las moléculas muy grandes en pequeños fragmentos que pueden ser removidos fácilmente por la acción de los detergentes. Oxidación, hidrólisis y acción enzimática; son tres ejemplos de reacciones químicas para la limpieza.

Los ejemplos más comunes de un agente oxidante, son: el hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, percarbonato de sodio y de ozono. La hidrólisis involucra una reacción química en una solución acuosa, ya sea ácida o básica con un éster, una amida o un compuesto éter. La hidrólisis convierte una molécula de éster en una sal de un ácido orgánico y un alcohol, haciendo al residuo soluble en agua. Finalmente la acción enzimática acelera catalíticamente la descomposición de ciertas moléculas orgánicas como proteínas, facilitando la solubilidad de dichas moléculas. 23

2.2 Requisitos que debe cumplir la limpieza para ser eficiente:

- a) Eliminar los substratos orgánicos que puedan alojar y favorecer el crecimiento bacteriano.
- b) Eliminar colonias bacterianas establecidas en zonas con materia orgánica presente.
- c) Evitar la desactivación del sanitizante por materia orgánica presente.
- d) Facilitar la penetración del sanitizante y su contacto con la superficie de los equipos, al no existir impurezas que lo impidan.

3. **Sanitización:** (Desinfección). El procedimiento de sanitización consiste en la eliminación total de agentes microbianos no patógenos y patógenos.

Desinfección: Consiste en la eliminación total de los microorganismos existentes después de la limpieza, consiguiendo eficazmente que los microorganismos presentes pierdan su capacidad de crecimiento y reproducción en forma irreversible, mediante agentes químicos, métodos físicos o ambos; evitando así la contaminación de los productos por algún sobreviviente al lavado que pudiera reproducirse y contaminar al encontrar condiciones óptimas para ello. Generalmente no matan las esporas.

Sanitizante: Agente químico que destruye a los microorganismos contaminantes presentes en cualquiera de sus formas en una área específica, pero no necesariamente esporas.

Los sanitizantes generalmente se aplican sobre objetos inanimados como en la desinfección de equipos de plantas productoras de medicamentos, áreas, etc.

Un desinfectante eficaz reduce el número de microorganismos a un nivel que no perjudica la salud, pero ningún procedimiento de sanitización puede dar resultados satisfactorios, a menos que su aplicación le preceda una limpieza eficiente 9.

Ciclado de sanitización: La sanitización se realizará utilizando agentes químicos de diverso origen, pero que tengan siempre un poder bactericida demostrado. Dado que muchos microorganismos pueden crear resistencias al ataque de estos agentes químicos, es recomendable el ciclado de los mismos. Este ciclado usará alternativamente agentes químicos que utilicen radicales químicos distintos para ejercer su acción, ya que esto dificulta la aparición de microorganismos resistentes 16.

3.1 Los sanitizantes deben seleccionarse considerando:

- Los microorganismos que se desean eliminar.
- El tipo de producto que se elabora.
- El material de las superficies que entran en contacto con el producto.
- El tipo de agua disponible.
- Método de limpieza empleado.

3.2 Las características de un agente químico son:

1. **Actividad antimicrobiana.** A bajas concentraciones debe tener un espectro de actividad antimicrobiana amplio, por lo tanto debe matar o inhibir muchos tipos diferentes de microorganismos.
2. **Solubilidad.** La sustancia debe ser soluble al agua u otros solventes adecuados que incremente la actividad antimicrobiana.
3. **Estabilidad.** Debe conservar su actividad por períodos razonables que permitan su comercialización.
4. **Toxicidad.** No debe ser tóxico para el hombre y los animales.
5. **Homogeneidad.** La preparación debe ser uniforme en su composición, de tal forma que los ingredientes activos estén presentes en cada aplicación; los ingredientes no deben agregarse o sedimentarse.
6. **Inactivación mínima con materia extraña.** Algunos agentes químicos se combinan fácilmente con proteínas y otros materiales orgánicos. Esto disminuye la cantidad de agente disponible para actuar contra los microorganismos.
7. **Actividad a temperatura ambiente.** No debe ser necesario elevar la temperatura ambiental cuando se use el agente químico.

3.3 Factores que afectan la eficacia de los agentes químicos.

1. **Inactivación debida a la suciedad.** La presencia de suciedad y otros materiales sedimentados reducen la eficacia de todos los agentes químicos.

Cuando hay mucha suciedad los desinfectantes no presentan ningún efecto; por lo que la desinfección con sustancias químicas deberá efectuarse después de un proceso de limpieza o en combinación con el mismo.

2. **Temperatura de la solución.** La sanitización será más eficaz, cuanto más alta sea la temperatura. Es preferible usar, por lo tanto, una solución desinfectante tibia o caliente que una fría. Por lo que se deberán seguir las indicaciones del fabricante; ya que a temperaturas superiores de 43 °C los yodoforos liberan yodo pudiendo manchar los materiales, y la acción corrosiva del Cl_2 aumenta al usar soluciones calientes de hipoclorito. En general, a temperaturas elevadas, mayor será la velocidad de muerte de la población.

3. **Tiempo.** Los desinfectantes químicos necesitan un tiempo de contacto para que sean eficaces. Este tipo de contacto mínimo, puede variar de acuerdo con la actividad del desinfectante. A mayor tiempo, mayor número de células muertas.

Concentración. La concentración necesaria de la solución del desinfectante, variará de acuerdo con las condiciones de uso, además deberá ser adecuada, con la finalidad destinada y el medio ambiente que haya que emplearse. Las soluciones deberán de prepararse siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante.

Estabilidad. Todas las soluciones desinfectantes, deberán ser de preparación reciente, en los que se hayan utilizado utensilios limpios. El mantenimiento prolongado de soluciones diluidas listas para ser usadas, puede reducir su eficacia, o convertirse, tal vez, en un depósito de organismos resistentes. Los desinfectantes pueden desactivarse si se mezclan con detergentes y otros agentes químicos no adecuados.

Es necesario verificar periódicamente la eficacia de las sustancias químicas, especialmente cuando se han disuelto para usarlas, existen para tal fin equipos de apoyo baratos y de fácil uso.

Precauciones.

- § sanitizantes que pueden envenenar los productos (alimentos, medicamentos),
- § como los fenólicos, no deben usarse en las industrias de insumos para la salud, ni en vehículos para su transporte. También debe tenerse cuidado de que no dañen al personal y animales.

6. **pH.** La concentración de los iones hidrogenados tienen, efecto sobre la acción de los agentes químicos, así como de los microorganismos.

7. **Naturaleza de microorganismos.** La composición química de los microorganismos varía; por lo tanto se considera que las bacterias Gram (-), son más resistentes a la mayoría de los sanitizantes con respecto a las bacterias Gram (+).

8. **Tamaño de la población.** Destruir grandes poblaciones requiere más tiempo que destruir pequeñas poblaciones.

9. **Fase de crecimiento.** Los cultivos jóvenes son más susceptibles a los sanitizantes que los cultivos viejos, debido a que los primeros se encuentran en una adaptabilidad metabólica.

10. **Presencia de esporas.** Las esporas bacterianas constituyen la forma de vida más resistente a los agentes fisicoquímicos.

11. **Naturaleza del material tratado.** Las características del material, alteran la velocidad de muerte celular. ^{3,19,23,38}

3.4 Tipos de Agentes Químicos Antimicrobianos.

3.4.1 Clasificación.

Los sanitizantes pueden clasificar de acuerdo a:

La estructura química.

- Fenol y sus derivados.
- Alcoholes.
- Agentes oxidantes:
 - ◆ Halógenos.
 - ◆ Peróxido de hidrógeno.
- Metales pesados.
- Agentes tensoactivos.
- Agentes Alquilantes (aldehídos).

El mecanismo de acción antimicrobiano.

- Agentes que lesionan la membrana celular.
- Agentes que desnaturalizan las proteínas.
- Agentes que modifican los grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos.

3.4.1. a Características.

Las sustancias químicas como los fenoles, hipoclorito de sodio (blanqueador), y los cuaternarios de amonio, se utilizan comúnmente para desinfectar objetos inanimados como pisos y equipo.

• Fenoles y sus derivados.

Los compuestos fenólicos a concentraciones bajas tienen una acción bactericida rápida; actualmente se ha limitado el uso del fenol (ácido carbónico) como antiséptico, porque desnaturaliza la piel al estar en contacto, sin embargo algunos antisépticos para la garganta contienen bajas concentraciones de fenol; así, como el uso de nuevos agentes bactericidas. El fenol ha sido reemplazado como desinfectante por los derivados fenólicos menos cáusticos y menos tóxicos, siendo químicamente semejantes al fenol, ya que ambos tienen un grupo hidróxilo, en el anillo del benceno.

Los derivados fenólicos aumentaron la actividad microbiana del fenol al sustituirle diferentes grupos en el núcleo fenólico; siendo los de mayor importancia los derivados alquilo, clorados y los difenilos. Fueron desinfectantes muy populares, sin embargo se requieren altas concentraciones para producir el efecto deseado de desinfección.

ENOL

Clase: fenólico.

Efectivo contra las bacterias Gram (+) y Gram (-), poco efectivo contra esporas bacterianas. Más activo a pH ácido.

Oxida en presencia de luz y aire; en solución acuosa se puede esterilizar a 121°C durante 15 minutos, mientras que en solución aceitosa puede esterilizarse a 150 °C durante una hora.

Incompatible con sales alcalinas y ferrosas; su actividad se reduce con agentes iónicos.

Se inactiva a diluciones menores a 0.25% ó mayores de 0.5% y con twcen 80 al %.

Concentración de uso. 0.25 - 0.5%.

* Son poderosos compuestos desnaturizadores, inactivan proteínas celulares vitales, incluyendo enzimas.

Derivados fenólicos.

También son agentes desnaturizadores, inactivan proteínas celulares vitales, incluyendo enzimas; y actúan sobre lípidos, debido a que constituyen a la membrana plasmática junto con las proteínas, el primer efecto perceptible es la ruptura de la membrana celular.

FENOXIETANOL

* Clase: Derivado fenólico.

* Amplio espectro de actividad antimicrobiana, activo contra *Pseudomonas aeruginosa*.

* Es estable en solución acuosa, puede esterilizarse en autoclave, y es compatible con surfactantes aniónicos y catiónicos. Reduce su actividad en presencia de algunos agentes no iónicos.

* Se inactiva a diluciones menores del 1.0% ó con tween 80 al 10%.

* Concentración de uso al 1.0 %

• Alcoholes.

Los alcoholes son compuestos con un grupo hidróxilo (OH). Destruyen a los microorganismos rompiendo los enlaces lipídicos de las membranas celulares y por desnaturización de proteínas. La cadena de carbonos penetra la región hidrofóbica de la membrana celular, desorganizándola y permitiendo la salida de compuestos vitales para la célula.

Los alcoholes tales como el etanol e isopropílico, se usan ampliamente como antisépticos.

ETANOL.

Clase: Alcohol.

Es bactericida para formas vegetativas, no esporicida, gram negativos, gram positivos ácido-resistentes. La presencia de agua es indispensable para su actividad.

Es usado como solvente y como preservativo en preparados farmacéuticos.

Se inactiva por dilución menor del 50% o mayor 70%.

Su concentración de uso es: 100% inefectivo.

50 - 95% bactericida, (mayor efectividad del 50-70%).

<30% poca acción.

ALCOHOL BENCILICO.

- * Clase: Alcohol.
- * Es bactericida para formas vegetativas, esporicida, activo contra hongos, también presenta propiedades anestésicas.
- * Es estable aún en condiciones de autoclave (121°C durante 15 minutos). Se oxida lentamente a benzaldehído y ácido benzoico en presencia de aire y a pH ácido.
- * Es incompatible con agentes oxidantes, y se inactiva con surfactantes no iónicos.

• Agentes oxidantes.

◆ Halógenos.

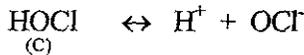
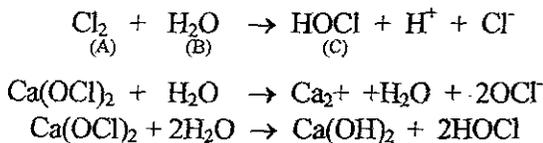
Los halógenos Iodo y Cloro agentes oxidantes que inactivan las enzimas por la oxidación de sus grupos funcionales, particularmente el grupo sulfidrilo (SH), los agentes más activos también atacan grupos amino (NH₂) e hidróxilo (OH). Son únicos entre los desinfectantes en el sentido de que su actividad es casi exclusivamente bactericida y que son efectivos contra microorganismos que esporulan.

El **Iodo** existe principalmente en I₂ a valores de pH inferiores a 6 donde tiene su máximo de acción bactericida. El germicida disminuye a medida que se incrementa por encima de 7.5.

El yodo se usa como un antiséptico sin daño a la piel, en solución acuosa y tintura (2% yodo y 2.4% yoduro sódico en alcohol acuoso 1:1). Los yodoforos son mezclas de yodo y detergentes conocidos como transportadores. Los transportadores son polímeros sintéticos que sirven para aumentar la solubilidad del yodo y proporcionar un reservorio para la liberación sostenida del halógeno. En medicina humana los yodóforos son seguros para desinfectar la piel antes de una cirugía, reemplazando a las soluciones acuosas y a las tinturas de yodo por que producen menos efectos colaterales; y en la industria son utilizados para la esterilización de equipos. Tiene una amplia gama de actividad antimicrobiana. Para superficies limpias normalmente requiere de una solución de 25 a 50 mg / L de yodo disponible a pH 4.

El **cloro** se utiliza como desinfectante en tres tipos de compuestos clorados: cloro, clorito, cloraminas inorgánica y orgánica. Las propiedades de desinfección de estos compuestos dependen de la capacidad para la liberación de cloro libre; es decir,

Al adicionar cloro ó hipoclorito al agua, el cloro (A) reacciona con el agua (B) para formar ácido hipocloroso (C), el cual en solución neutra o ácida es un agente oxidante fuerte y desinfectante efectivo.



La disociación del ácido hipocloroso depende del pH, determinando la eficiencia de la desinfección.

Los hipocloritos son los compuestos clorados más útiles y se encuentran disponibles en estado líquido ó polvo en sales de calcio, litio y sodio. Son empleados a gran escala en la industria farmacéutica, láctea y alimenticia para el saneamiento del equipo utilizado en el procesamiento de los productos, también son empleados como agentes sanitarios en los hogares, hospitales y edificios públicos.

El hipoclorito de sodio (blanqueador) tiene una capacidad de desinfectante superior, debido a que mata muchos tipos de bacterias y virus, es barato y fácil de conseguir. Este producto debe utilizarse con mucho cuidado, ya que puede dañar tejidos delicados como los ojos.

La actividad microbicida del cloro disminuye notablemente con la presencia de materia orgánica; por lo cual solo es usado para tratar sustancias que contienen bajas cantidades de materia orgánica como el agua; sin embargo los blanqueadores por no contener detergentes son efectivos cuando se utilizan sobre materia orgánica.

Concentración de uso: 0.6 a 1.0 ppm de cloro libre residual para asegurar una destrucción rápida entre 15 y 30 segundos ó 0.6 a 4.0 ppm de cloro libre para matar a todo tipo de microorganismos en 30 a 45 segundos.

Peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrogeno se usa a una concentración del 3% como antiséptico inocuo cuyo uso principal es en la limpieza de heridas e instrumentos médicos.

Cuando el peróxido entra en contacto con el tejido burbujea vigorosamente por la liberación del oxígeno, debido a que todas las células de los microorganismos aerobios,

incluyendo la del hombre contienen la enzima catalasa que descompone al peróxido en oxígeno y agua, provocando una acción germicida breve.



El H_2O_2 mata antes de ser destruido por la catalasa u otra enzima; pero existen bacterias relativamente resistentes al peróxido como *Staphylococcus aureus* por producir grandes cantidades de peroxidasa.

• Metales pesados.

Las sales de metales pesados como el mercurio, arsénico y plata reaccionan con grupos sulfidrilos ($\text{SH}-$) de proteínas, envenenan enzimas y por medio de este mecanismo las sales de mercurio y plata son usadas ampliamente en medicina durante muchos años porque mataron a las células microbianas.

La sal de mercurio (cloruro mercúrico) se uso ampliamente como un antiséptico, pero actualmente no se usa por ser tóxico. Compuestos orgánicos que contienen mercurio (mercaptán, merthiolate y mercurio cromo), son menos tóxicos y ambos son básicos en el botiquín de un hogar para desinfectar piel y membranas mucosas. Las sales de fenilmercurio se encuentran entre los inhibidores más efectivos de bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos, levaduras y algas; han resultado útiles especialmente en el control de *Pseudomonas sp.* y otros contaminantes microbianos en preparados farmacéuticos, oftálmicos y cosméticos.

Las sales de plata y plata coloidal fueron antisépticos ampliamente utilizados, las sales de plata inorgánica son agentes bactericidas eficaces, pero están restringidos por sus efectos irritantes y cáusticos. Durante muchos años se utilizó una solución de nitrato de plata (AgNO_3) por ser altamente bactericida para el gonococo y utilizado en México por ley en muchas regiones, para la profilaxis de la oftalmía neonatal en los recién nacidos; hoy sin embargo, la tendencia es dejar de usar dicha solución y sustituirla por antibióticos. En general el uso de las sales de plata se ha limitado a que puede irritar la piel, sin embargo la aplicación tópica AgNO_3 ó sulfadiazina de plata en crema en quemados ha reducido significativamente la mortalidad entre estos pacientes; pero a aumentado la incidencia de microorganismos resistentes al ión Ag^+ en ambientes hospitalarios limitando su uso como tratamiento exclusivo.

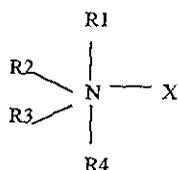
• Tensioactivos.

Los compuestos tensioactivos son aquellos que poseen en su estructura molecular una parte que atrae el agua (hidrófila) y otra que la repelen (hidrófoba); dependiendo de la carga o ausencia de ionización de la parte hidrófila, se clasifican en aniónicos, catiónicos y anfotericos, siendo los catiónicos y los aniónicos los agentes antimicrobianos más útiles.

Entre los tensioactivos aniónicos se encuentran los jabones y los ácidos grasos que se disocian para dar un ion con carga negativa, presentan una mayor actividad a pH ácido son efectivos contra microorganismos grampositivos pero relativamente ineficaces contra gramnegativos debido a su membrana lipopolisácarida.

Los agentes microbacterianos tensioactivos más importantes son los catiónicos en los cuales un residuo hidrófobo está balanceado por un grupo hidrófilo con carga positiva; algunos detergentes catiónicos tienen actividad germicida porque penetran y destruyen los fosfolípidos de las membranas incluyendo la membrana plasmática de la célula microbiana.

Las sales cuaternarias de amonio son detergentes catiónicos que significa con carga positiva. Tienen un átomo de nitrógeno (grupo amino) hidrófilo, unido a grupos orgánicos hidrofobos (de ahí el nombre de cuaternarias).



dónde:

R1 - R4: grupos alquilo iguales o diferentes.

N: átomo de nitrógeno con valencia de 5.

X: habitualmente un halógeno

Estos compuestos matan toda clase de microorganismos y virus con membranas. Las sales cuaternarias de amonio son principalmente activas con bacterias Gram (+), y concentraciones más altas son requeridas para matar bacterias Gram (-), a causa de sus membranas hidrófilas protectoras. Las sales cuaternarias de amonio actúan contra hongos por su efecto fungistático.

Estas sales cuaternarias de amonio son incompatibles con gran cantidad de sustancias químicas como detergentes aniónicos (tween 20, tween 80), fosfolípidos, citinas) y otras sustancias conteniendo grasas, ya que neutralizan su capacidad infectante.

Las sales cuaternarias de amonio no son tóxicas, se usan como desinfectantes en el hogar, industrias, laboratorios y hospitales; así como el ingrediente activo de productos ampliamente usados como cepacol (cloruro de cetil piridinio) y zephi (cloruro de benzalconio).

Cuando se utilizan simultáneamente, los detergentes catiónicos y los aniónicos se neutralizan entre sí.

CLORURO DE BENZALCONIO

* Clase: compuesto cuaternario de amonio.

* Actividad antimicrobiana fuerte, es más activa contra Gram (+) con efectos letales a concentraciones de 1: 200 000. Los Gram (-) son más resistentes pues requieren concentraciones de 1: 300 000, o más altas cuando esta presente

Pseudomonas aeruginosa .

* Más activo a pH neutro o a pH alcalino; se inactiva a pH menor a 3.4.

* La actividad antifúngica limitada, no esporicida.

* Estabilidad: tiene buena estabilidad aún en condiciones de autoclave.

Compatibilidad. Es incompatible con surfactantes aniónicas, jabones, citratos, citratos, yodo, metales pesados, alcalis, algunos oxidantes y proteínas.

Inactivador: Lecitina y surfactantes no ionicos como lugol W o tween 80.

Concentración de uso: 0.01 a 0.25 %.

Agentes Alquilantes (aldehídos).

formaldehído, glutaraldehído y óxido de etileno son agentes alquilantes, los cuales caracterizan por unir cadenas cortas de átomos de grupos alquilo a enzimas, activándolas y matando la célula.

formalina es una solución de formaldehído a 37% usada para conservar tejidos para embalsamar. Mata todo tipo de microorganismos incluyendo endosporas. Concentraciones más bajas de formaldehído 0.02 a 0.01 se usan para inactivar virus.

glutaraldehído se usa para esterilizar en frío instrumentos quirúrgicos o equipo de plástico sensibles a las temperaturas de esterilización por calor. Es el único desinfectante usado en frío y recomendado por los Centers for Disease Control de los Estados Unidos para usarse en equipo de tratamiento respiratorio

El óxido de etileno tiene ventajas especiales como agente esterilizante por que es un gas y por lo tanto desaparece de los objetos después del tratamiento; sin embargo el óxido de etileno es sumamente tóxico, por lo cual debe usarse en una cámara de gas sellada.

Por ser sumamente inflamable y explosivo se vende como CARBOXIDE que es una combinación del 90% de oxido de etileno y 10 % de CO₂. Mata todo tipo de bacterias incluyendo endosporas.

3.4.1. b Mecanismo de acción.

Los mecanismos por medio de los cuales las drogas matan o inhiben la multiplicación de los microorganismos son variados y complejos. Todos los efectos observables de los agentes químicos sobre las bacterias son el resultado de alteraciones en sus componentes macromoleculares; algunos de estos cambios lesionan la membrana celular, otros inactivan de forma irreversible las proteínas y varios inducen un daño profundo en los ácidos nucleicos.

Agentes que lesionan la membrana celular.

La integridad estructural de la membrana depende de la disposición ordenada de las proteínas y los lípidos que la componen. Los solventes orgánicos y los detergentes alteran esta organización estructural, lo que interfiere sobre la función normal de la membrana. El efecto neto es la liberación de pequeños metabolitos de la célula y la interferencia sobre el transporte activo y el metabolismo energético.

Fenol y sus derivados:

En concentraciones bajas estos compuestos tienen una acción bactericida rápida que provoca la pérdida del contenido celular y la inactivación irreversible de las oxidasas y las deshidrogenasas unidas a la membrana.

Alcoholes:

Los alcoholes permiten observar la interacción de los solventes orgánicos con las membranas lipídicas. Desorganizan la estructura lipídica por penetración en la región hidrofóbica. Además de su efecto sobre la membrana celular, los alcoholes y otros solventes orgánicos también desnaturalizan las proteínas celulares.

- **Agentes tensoactivos:**

La interfase entre la membrana de una célula bacteriana que contiene lípidos y el medio acuoso que la rodea proporciona un sitio blanco susceptible para agentes de este tipo. La porción hidrófoba de la molécula es una cadena hidrocarbonada liposoluble, mientras que la porción hidrófila puede ser un grupo ionizable o uno no iónico pero con una estructura altamente polar.

Cuando las bacterias se exponen a este tipo de agentes, el grupo con carga positiva se asocia con los grupos fosfato de los fosfolípidos de la membrana, mientras que la porción no polar penetra en el interior hidrófobo de la membrana. La distorsión resultante provoca una pérdida de la semipermeabilidad de la membrana y filtración de los compuestos nitrogenados y fosforados contenidos en la célula, por lo tanto el agente químico puede penetrar a la célula y desnaturalizar sus proteínas.

Agentes que desnaturalizan proteínas.

Los agentes que alteran la conformación de las proteínas por desnaturalización producen un desplegamiento de la cadena polipeptídica de manera que las cadenas se presentan irrolladas o enrolladas al azar y de forma irregular. Entre estos agentes se encuentran los ácidos (ácido benzoico, láctico, acético, cítrico y propiónico), los álcalis, alcoholes, acetona y otros solventes orgánicos; siendo su blanco principal parece ser la membrana celular.

Agentes que modifican los grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos.

El sitio catalítico de una enzima contiene grupos funcionales específicos que se unen al sustrato e inician los episodios catalíticos. La inhibición de la actividad enzimática se produce cuando uno ó más de estos grupos funcionales es alterado o destruido. Grupos funcionales importantes de la pared, la membrana o los ácidos nucleicos de la célula son susceptibles a la inactivación.

Agentes oxidantes:

- ◆ Halógenos.
- ◆ Peróxido de hidrógeno.

Inactivan las enzimas por conversión de los grupos funcionales $-SH$ en la forma oxidada $-S-S-$; los agentes más potentes también atacan los grupos amino, indol y el grupo p-oxifenólico de la tirosina.

• Metales pesados.

Las sales solubles de arsénico, plata y otros metales pesados envenenan la actividad enzimática formando mercáptidos con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína. La reacción inicial es reversible y si se proporcionan grupos -SH extraños en forma de aglutinación o de tioglicolato de sodio la mayor parte de las células se recuperan.

• Agentes Alquilantes (aldehídos).

Los efectos letales del formaldehído, óxido de etileno y el glutaraldehído resultan de su acción alquilante sobre las proteínas; la inhibición producida por estos agentes es irreversible, como consecuencia de una modificación de las enzimas y la inhibición de la actividad enzimática.

Agentes sanitizantes recomendados para usarse en los programas de desinfección.

Agente sanitizante	Aplicación	Ventajas	Desventajas
Hipoclorito de sodio	Desinfectante acuoso.	Relativamente rápido.	Efectividad dependiente de pH.
	Industria Farmacéutica, alimenticia y lechera.	Puede usarse en superficies para preparar el producto.	Es inactivado por materia orgánica, luz UV y calor.
		No se altera con aguas duras.	Olor desagradable.
			No tiene efecto esporicida. Limpieza pobre. Corroe metales. Puede blanquear superficies.
Dióxido de cloro	Superficies duras y esterilizante.	Tuberculicida, viricida y esporicida.	Corroe algunos metales.
		Mata rápidamente Mycobacterium tuberculosis.	Vida corta después de su activación.
		Puede ser usado en material termolábil.	Se inactiva con materia orgánica.
Iodoformos	Superficies duras, sanitizante y desinfectante.	No se altera con aguas duras.	Puede manchar
		Puede usarse sobre superficies para prepararse producto.	Puede irritar membranas mucosas.
		Buena actividad limpiadora	Se inactiva por exposición a luz UV, calor y materia orgánica
Compuestos fenólicos	Superficies duras, sanitizantes	Tuberculicida	
		Amplio espectro	Efectividad reducida por la presencia de cationes
		Puede ser bacteriostático	En algunos lugares hay restricciones para su deshecho
		Buena actividad limpiadora	No es esporicida.
		Elección para áreas de alto riesgo	
Cateterios de a nonio (impuestos e orados)	Superficies duras, desinfectante y sanitizante	Espectro amplio.	Pueden no ser efectivos contra <i>Pseudomonas</i> .

Agente sanitizante	Aplicación	Ventajas	Desventajas
		Puede ser bacteriostático.	Generalmente no son tuberculicidas.
		Buen deodorizante.	No son esporicidas.
		Puede ser utilizado en superficies para preparar productos.	Su actividad es reducida por la presencia de jabones.
		Excelente acción limpiadora.	
Alcoholes (butil, etil, propil).	Superficies duras, desinfectante y sanitizante aéreo.	Tuberculicida.	No tiene acción detergente.
		Espectro amplio.	Son volátiles e inflamables.
		Puede tener actividad residual si se le mezcla con cuaternarios o fenoles	No tiene actividad esporicida
Glutraldehído	Superficies duras, esterilización y desinfección.	No mancha. No corrosivo.	No es estable cuando se le utiliza en soluciones diluidas.
		Esporicida, tuberculicida y víricida	Corrosivo en formulaciones con pH bajo.
		Util en la esterilización de plásticos, hules, lentes y otros artículos que no se puedan esterilizar con autoclave.	Puede irritar la piel y membranas mucosas
			Es inactivado por presencia de material orgánico.
			Es un sensibilizador potencial, con olor fuerte.

El siguiente cuadro muestra ventajas y desventajas de algunos grupos de sanitizantes.

PROPIEDADES	SALES CUATERNARIAS	HALOGENOS YODO-CLORO	GLUTARALDEHIDOS
Actividad en presencia de materia orgánica	Efectividad moderada.	Baja efectividad	Baja efectividad.
PH	Neutro. Bajo rango de tolerancia: 7-9	Acidos (rango 4-6)	Actúa en medio alcalino
Coefficiente fenólico	Moderadamente bajo	Bajo	Bajo
Aguas duras	Baja efectividad	No trabaja en presencia de éstas	Baja efectividad
Tensoactividad	Menor potencia tensoactiva	No son tensoactivos, menor penetración	No son tensoactivos
Toxicidad	Baja toxicidad	Altamente tóxicos Tolerancia en el aire Cloro 1 ppm. Yodo 0.1 ppm.	Fuertemente irritante para la piel y ojos y vías respiratorias
Corrosión	Moderada acción corrosiva	Altamente corrosivo	Corrosivo en elementos metálicos
Estabilidad	Estables	Sufre óxido - reducción por el aire y la luz.	Estable por pocos días
Efecto residual	Moderado	Sin efecto	Bajo efecto
Contaminación	Biodegradable	Los contaminantes actúan como acidificantes de aguas y suelos	Altera propiedades organolépticas
Efecto desodorante	No desodorante	No desodorante	No desodorante

2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA METODOLOGÍA (Morfológicas, Patogenicidad e Identificación).

4.1 *Staphylococcus*.

Los estafilococos son Gram (+), esféricos, no móviles, no esporulados, aparecen individualmente, en pares en cuatro y en forma de racimos de uvas. Son aerobios y anaerobios facultativos. Los coagulasa - positivos producen una gran variedad de toxinas en general son potencialmente patogénicos.

Staphylococcus aureus.

Características de cultivo.

La temperatura óptima para estas especies es de 37°C, pero su crecimiento se puede observar desde 10°C a 45°C.

Las colonias en agar TSA ó AME son de 1.0 a 2.0 mm de diámetro, color amarillo anaranjado, circulares con consistencia parecida a la mantequilla. Las colonias jóvenes no presentan color, pero las maduras oscilan entre el naranja y el blanco.

Los medios de aislamiento primario son agar sangre y caldo de tioglicolato incubados a 37°C en atmósferas de 3-5% de CO₂; las colonias en agar sangre normalmente presentan hemólisis y en los cultivos de caldo son turbios.

Morfología.

S. aureus son esferas gram positivas que característicamente aparecen como racimos de 8 pero también aparecen sueltos, por parejas y ocasionalmente en cadenas de tres o cuatro que son morfológicamente difíciles de distinguir de los estreptococos.

Identificación.

Las especies son normalmente coagulasa - positivas, fermentan de manera anaeróbica el manitol y la glucosa, son DNA - asa positivos y capaces de crecer en un medio de cultivo de Sodio al 6.5%.

Tabla 1. Reacciones metabólicas y enzimáticas:

Características	<i>S. aureus</i>
Reacción de Gram	+
Crecimiento anaerob.	+
VP	+
Oxidasa	-
Coagulasa	+
Ferm. de azúcares:	
Lactosa	+
Maltosa	+
Manitol	+
Celobiosa	-
Fructosa	+

Características	<i>S. aureus</i>
Rafinosa	-
Xylosa	-
Manosa	+
Trehalosa	+
Fosfatasa	+
Nitrato	+
Arginina	+
Urea	d
Proteasa	+
Novobiocina	s

+ = Reacción positiva (85-100%)
 - = Reacción negativa (0-15%)

d = Variable (16-84%)
 s = Sensible

Patogenicidad.

Formas clínicas de infección estafilocócica depende del tamaño de la dosis, ruta de invasión, presencia o ausencia de anticuerpos de anteriores infecciones, susceptibilidad al huésped. Las infecciones más comunes causadas por *S. aureus* incluyen erupciones, cistitis e impétigo. Complicaciones más severas pueden ser septicemia, endocarditis, meningitis, absceso cerebral, sepsis puerperal, trombosis de los senos cavernoso y orbital, osteomielitis y neumonía. Complicaciones secundarias seguidas de infecciones pulmonares primarias son empiema, absceso pulmonar y bronquiectásicas. enteritis estafilocócica puede complicar la terapia por antibióticos.

Toxinas y resistencia.

Algunas clases de *S. aureus* producen varias exotoxinas, y una poderosa exotoxina que es causante del envenenamiento de la comida. Un gran porcentaje de las cepas aisladas en hospitales son resistentes a la penicilina. Algunas pueden producir penicilinas, la cual es inactiva a la penicilina.

4.2 *Bacillus*.

Bacillus subtilis.

Características del cultivo

Las colonias en medio de agar como AME (agar métodos estándar) TSA (agar soya tripticaseína) son redondas o irregulares; tienen la superficie pálida o mate, blancas; pero les ocurre una serie de cambios, ya que empiezan a opacarse, pueden arrugarse y pueden cambiar de color a un crema o café.

Morfología.

Estas especies son comunes como contaminantes de laboratorio. Son bacterias Gram (+) que miden de 2.0 a 8.0 micras de largo por 0.7 a 0.8 de grueso, no presentan cápsula, y pueden estar de manera individual o en pequeñas cadenas. Las esporas son elipsoidales o cilíndricas, localizadas al centro o a la periferia. La germinación de esporas es ecuatorial.

Identificación.

Tabla 1. Reacciones metabólicas y enzimáticas:

Características	<i>B. subtilis</i>
Reacción de Gram	+
Células en cadena	d
Motilidad	+
Posición de espora	V
Crecimiento a 50°C	+
Crec. en 10% NaCl	d
Crec. anaeróbico	-
Ferm. de azúcares:	
Glucosa	+
Celobiosa	+
Galactosa	d
Manosa	+
Melibiosas	d

= Reacción positiva (85-100%)

d = Reacción negativa (0-15%)

Características	<i>B. subtilis</i>
Rafinosa	+
Salicina	+
Xylosa	d
ONPG	+
Citrato	+
Urea	-
Indol	-
VP	+
Red. De Nitrato	+
Hidrol. de caseína	+
Hidrol. de hipurato	d
Hidrol. de almidón	+
Oxidasa	-

d = Variable (16-84%)

V = Espora central/subterminal

Patogenicidad.

no considerados no patogénicos

4.3 *Enterobacter*

Características del cultivo

Las especies del género *Enterobacter* son aerobias pero anaerobias facultativas. La temperatura óptima es 37 grados centígrados. Las colonias son gruesas blancas, húmedas, suaves y enteras. El caldo de cultivo es turbulento; se presenta película, y la sedimentación es abundante.

Enterobacter cloacae, *E. aerogenes* y *E. hafniae* utilizan citrato como fuente única de carbón, dan una reacción Voges - Proskauer positiva, ornitina descarboxilato, y son negativas para indol y rojo de metilo. *E. agglomerans* (*Erwinia*) fallan la descarboxilación de ornitina y da respuestas variables en otras pruebas. Arginina dihidrolasa es positiva únicamente con *E. cloacae*. La lisina descarboxilasa es negativa con *E. cloacae* y *E. agglomerans* y positiva para *E. aerogenes* y *E. hafniae*. Miembros del género fermentan una variedad de azúcares incluyendo lactosa, con la producción de ácido y gas.

Morfología

Las especies del género *Enterobacter* se agrupan en barras Gram (-) de 0.5 a 0.8 micras de ancho por 1.0 a 2.0 micras de largo, agrupándose individualmente. Son frecuentemente encapsuladas y usualmente móviles.

Identificación

Tabla 1. Reacciones metabólicas y enzimáticas:

Características	<i>E. cloacae</i>
Motilidad	d
Pigmento amarillo	-
Pigmento rojo	-
Crec. Mc Conkey	+
Citrato de Simmons ⁷	+
Citrato Chistensen's	+
Urea	d
Ferm. de azúcares:	
Adonitol	d
Arabinosa	+
Celobiosa	+
Dulcitol	-
Glicerol	d
Inositol	-
Lactosa	d
Maltosa	+
Manitol	+
Rafinosa	d
Ramnosa	+
Salicina	+

Características	<i>E. cloacae</i>
Trehalosa	+
Xylosa	+
Sorbitol	+
Sucrosa	+
Almidón	-
ONPG	+
H ₂ S desde TSI	-
Gluconato	+
Malonato	+
Fenilalanina	-
Arginina	+
Hidrol. de gelatina	d
Hidrol. de caseína	-
Lisina	-
Ornitina	+
Reducción Selenito	+
Producción DNasa	-
Gas en glucosa	+
Indol	-
RM (37°C _a / RT _b)	d/-
VP (37°C _a / RT _b)	d/d

= Reacción positiva (85-100%)

= Reacción negativa (0-15%)

= Variable (16-84%)

RT = Temp. (18-22°C)

a = Incubación /2días

b = Incubación /5días

Patogenicidad

Las especies del género *Enterobacter* son comúnmente encontradas en el tracto gastrointestinal humano. Pueden estar implicadas en infecciones del tracto urinario, oticemias y algunas otras infecciones clínicas.

4.4 *Escherichia*.

Escherichia coli

Características del cultivo

E. coli es aerobio y anaerobio facultativo. La temperatura óptima es entre 30 y 37 grados centígrados pero crece con frecuencia entre 10 y 45 grados centígrados. Las colonias en agar primario como TSA y AME son usualmente grises pero a veces blanco amarillentas de forma circular y borde entero, consistencia cremosa; formas atípicas aparecen frecuentemente. Los caldos de cultivo son turgentes con un pesado sedimento gris y sin película. Algunas especies son potencialmente mucoides. Las colonias en Agar endo son circulares y suaves, con una coloración azul rojiza que resulta de la fermentación ácida de lactosa; el ácido difunde en el medio circulante y causa un cambio de color que es detectado por la fucsina (indicador del pH). Las colonias en agar EMB son negruzcas, de consistencia suave, y de forma circular, con una película verde metálica, elevación convexa.

E. coli fermenta la mayoría de los carbohidratos con producción de ácido y gas, también produce indol, no licúa gelatina, es incapaz de utilizar citrato para su crecimiento, y no produce sulfato de hidrógeno en medio de TSI. Es oxidasa y ureasa negativo, produce una reacción Voges - Proskauer negativa, y una reacción positiva de rojo de metilo.

Morfología

E. coli se encuentra como barras, generalmente de 0.5 por 1 a 3 micras, pero varía de formas cocoides a barras largas, agrupándose individualmente, en parejas, o en cadenas cortas. Pueden ser móviles o no móviles, son usualmente no encapsuladas, no forman spora. *E. coli* se tiñe como Gram (-).

Identificación

Tabla 1. Reacciones metabólicas y enzimáticas:

Características	<i>E. coli</i>
Motilidad	d
Pigmento amarillo	-
Pigmento rojo	-
Crec. Mc Conkey	+
Citrato de Simmons'	-
Citrato Chistensen's	d
Urea	-
Ferm. de azúcares:	
Adonitol	-
Arabinosa	+
Celobiosa	-
Dulcitol	d
Glicerol	+
Inositol	-
Lactosa	d
Maltosa	+
Manitol	+
Rafinosa	d
Ramnosa	+
Salicina	d

Características	<i>E. coli</i>
Trehalosa	+
Xylosa	+
Sorbitol	+
Sucrosa	d
Almidón	-
ONPG	d
H ₂ S desde TSI	-
Gluconato	-
Malonato	-
Fenilalanina	-
Arginina	d
Hidrol. de gelatina	-
Hidrol. de caseína	-
Lisina	d
Ornitina	d
Reducción Selenito	d
Producción DNasa	-
Gas en glucosa	d
Indole	+
RM (37°C _a / RT _b)	+/+
VP (37°C _a / RT _b)	-/-

= Reacción positiva (85-100%)

= Reacción negativa (0-15%)

= Variable (16-84%)

RT = Temp (18-22°C)

a = Incubación /2 días

b = Incubación /5 días

atogenicidad

El género de *Escherichiae* es normal en el tracto intestinal humano; la más importante de este género, es *E. coli*, la cual ha sido asociada con infecciones esporádicas de ganos internos, en infantes diarrea epidémica, y esporádicamente "en verano" diarrea niños mayores. Los bacilos que se encuentran alojados en el colon son las más comunes causas de cistitis, pielitis y pielonefritis y frecuentemente causan apendicitis y tironitis. También se les ha asociado con sepsis puerperal e infecciones de vesícula biliar, ductos biliares, hígado, senos, bronquios y pulmones. Meningitis, septicemia, y locarditis se han reportado.

Algunos serotipos han sido responsables por diarreas epidémicas. Algunas especies producen una enterotoxina como la del cólera labil al calor.

4.5 *Pseudomonas*.

4.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Características del Cultivo.

La *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram negativo aerobio que se mueve por medio de flagelos polares; no crece en condiciones de anaerobios (excepto cuando se proporciona nitrato como aceptor terminal de neutrones). La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero un crecimiento bueno puede observarse a 42°C. Las colonias en agar TSA ó AME son grandes, forma circular, elevación convexa, borde entero, son de color grises - verdes con un centro oscuro y translúcido con orillas irregulares. Comúnmente las especies producen un pigmento azul - verde que se difunde en el medio. Con un olor característico a jugo de uva. Los cultivos en caldo presentan un pigmento de color amarillo - verde a azul, después se vuelven cafés.

Las lesiones patológicas pueden mostrar un exudado azul - verde. Las especies no fermentan azúcares comunes, pero si oxidan la glucosa y dan una fuerte reacción positiva a la oxidasa.

Morfología.

La *P. aeruginosa* presenta forma de bacilos individuales de 0.5 a 0.6 por 1.5 micras, en pares o en cadenas cortas. La especie tiene una alta motilidad ya que tienen de uno a tres flagelos polares. Se tiñe de Gram (-).

Identificación

Tabla 1. Reacciones metabólicas y enzimáticas:

Características	<i>P. aeruginosa</i>
Motilidad	+
Pigmento amarillo	-
Pigmento anaranjado	-
Pigmento verde	d
Pigmento café	d
Pigmento violeta	-
Crecimiento a 37°C	+
Crec. a 20-22°C	+
Crec. Mc Conkey	+
Citrato de Simmons ⁷	+
Citrato Chistensen's	+
Urea	d
Acido: 10% glucosa	+
10% lactosa	d
Oxidasa	+
O/F oxidativo	+
O/F alcalino	-
Red. Nitrato-nitrito	+
Ferm. de azúcares:	
Adonitol	-
Arabinosa	+
Celobiosa	-
Dulcitol	-
Glicerol	+
Inositol	-
Lactosa	-

= Reacción positiva (85-100%)

= Reacción negativa (0-15%)

Características	<i>P. aeruginosa</i>
Trehalosa	d
Sorbitol	-
Maltosa	-
Manitol	+
Rafinosa	-
Ramnosa	-
Salicina	-
Sucrosa	-
Hidrol. de almidón	-
Crec. Con cetrimida	+
ONPG	-
Crec. en PHBA	+
Gluconato	d
Malonato	+
Fenilalanina	-
Arginina	+
Hidrol. de esculina	d
Hidrol. de caseína	+
Lisina	-
Omitina	-
Reducción Selenito	d
Producción DRasa	d
Gas en glucosa	
Indol	
Crec. A 5°C	-
Crec. A 42°C	+

d = Variable (16-84%)

PHBA = Pol-β - hidroxibutirato

Patogenicidad.

Pseudomonas aeruginosa es un agente etiológico común de infecciones en el tracto nario, ojos, oído medio, intestinal (causa enteritis), ulceración crónica de la piel, infecciones en pulmones, válvulas del corazón, cerebro, sangre (bacteriemia), y meningitis (meningitis séptica). Además las infecciones por contaminación en heridas o maduras son comunes por la presencia de este tipo de microorganismo.

4.5.1 Burkholderia cepacia

La B. cepacia era conocida anteriormente como Pseudomonas cepacia. Es una bacteria ó un germen que vive en lugares húmedos ó mojados.

Características del Cultivo.

La B. cepacia es un bacilo gram negativo aerobio; no crece en condiciones de anaerobios. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Las colonias en agar TSA ó AME son grandes, forma circular, elevación convexa, borde entero, son de color crema grisáceo. Comúnmente las especies producen un pigmento azul - verde que se difunde en el medio. Con un olor característico a jugo de uva. Los cultivos en caldo presentan un pigmento de color amarillo - verde a azul, después se vuelven cafés. Las especies no fermentan azúcares comunes, pero si oxidan la glucosa y dan una fuerte reacción positiva a la oxidasa.

Morfología.

La B. cepacia presenta la forma de bacilos de 0.5 a 0.6 por 1.5 micras, en pares o en cadenas cortas. Se tiñe de Gram (-).

Patogenicidad.

La Burkholderia cepacia es un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos específicamente en pacientes con fibrosis enquistada (FC) ó en enfermedades crónica granulomatosas y se encuentra asociada a daño pulmonar.

La B. cepacia tiende a ser virulenta y resistente a la mayoría de los antibióticos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A pesar de que los productos del área de fabricación de líquidos (jarabes, emulsiones y suspensiones) son sometidos a pruebas de reto microbiano, algunos lotes fabricados se han tenido que destruir por presentar cuenta microbiana fuera de especificaciones conteniendo microorganismos contaminantes que no están incluidos en la prueba antes mencionada y que no están considerados como objetables, pero al encontrar un medio propicio para su crecimiento dan como resultado un producto con cuenta microbiana fuera de especificación.

Una probable fuente de contaminación en dichos lotes, podría ser que al final del proceso de fabricación y llenado del producto, los residuos acumulados dentro de los equipos y tuberías de llenado contengan microorganismos contaminantes que no estén siendo eliminados por los métodos de limpieza y sanitización usados, provocando una contaminación microbiana de lote a lote o cruzada.

En base a lo anterior, se tiene la necesidad de evaluar los métodos microbiológicos que verifican la limpieza y sanitización utilizados durante el proceso de fabricación y llenado; así como la evaluación de la efectividad de los agentes desinfectantes empleados en la limpieza y sanitización, proponiendo un ciclo de sanitización para el área de fabricación de líquidos que logre hasta eliminar la carga microbiana más resistente a los sanitizantes.

III. OBJETIVOS.

1. Evaluación de los procedimientos de limpieza y sanitización actuales en el área de líquidos, en base a un análisis retrospectivo de los resultados de pruebas microbiológicas realizadas en los equipos.

2. Comprobar la efectividad sanitizante de los germicidas y evaluar el % de recobro de microorganismos, mediante un muestreo microbiológico con hisopo con punta de algodón.

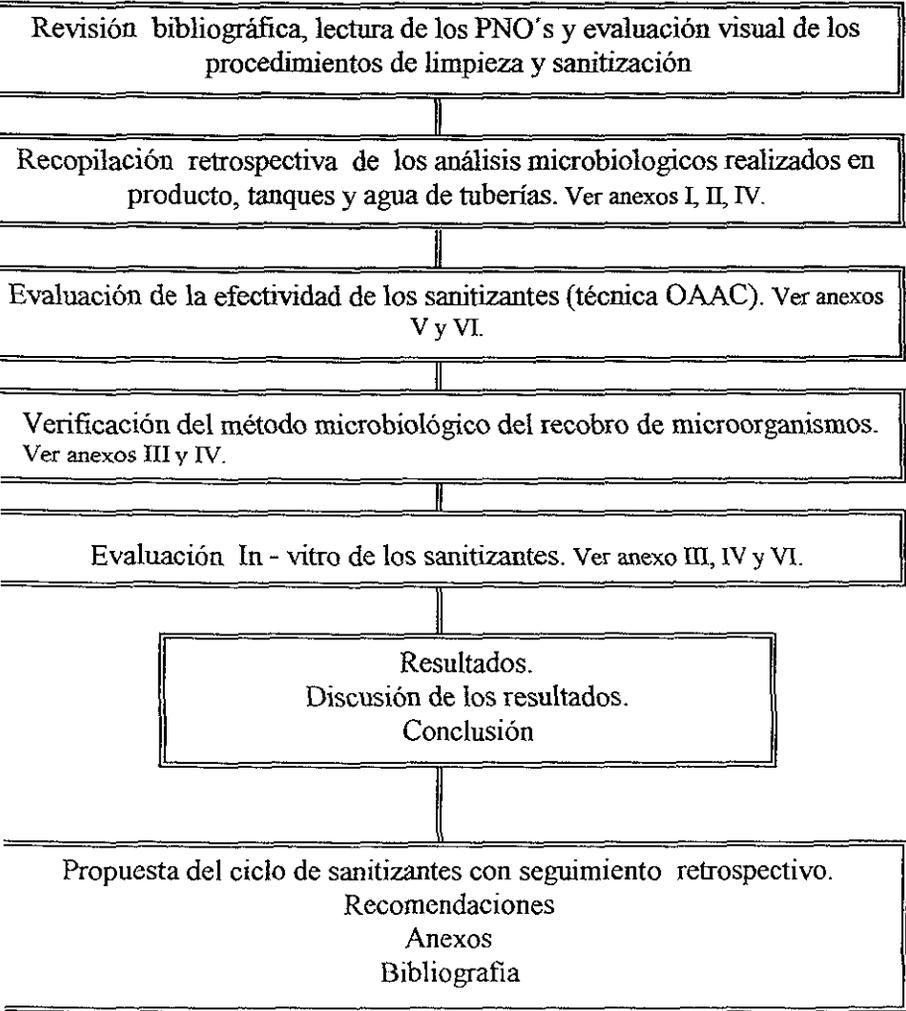
3. Próponer un programa de rotación de sanitizantes para el área de fabricación de líquidos; mediante un estudio microbiológico in vitro que compruebe la eficacia y cumplimiento de las especificaciones establecidas con este fin.

7. HIPÓTESIS.

De acuerdo al análisis de los datos recopilados de la evaluación microbiológica del producto, de la limpieza y sanitización de tuberías y tanques; así como del cumplimiento de los procedimientos, soportados con la verificación de las técnicas microbiológicas tanto la efectividad de los sanitizantes (técnica AOAC e In vitro), verificación del recobro microbiano con hisopo de punta de algodón. Se podrá realizar una medida preventiva a una probable causa de contaminación a los productos del área de líquidos no estériles con la implementación de un ciclo de sanitizantes con seguimiento prospectivo que asegure la erradicación de la contaminación no deseable evitando alguna alteración o afección posterior a dichos productos.

METODOLOGÍA GENERAL.

DIAGRAMA DE FLUJO.



VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1.

1.1 Material

- * Bata, cofia y tapabocas.
- * Matraz aforado de 100ml.
- * Tubos de ensaye de 16x150 y 13x100 con tapón de rosca.
- * Matraz Erlenmeyer de 125ml, 250ml, 500ml y 1000ml.
- * Pipetas graduadas de 1ml, 2ml, 5ml y 10ml.
- * Probeta graduada de 50ml, 100ml, 250ml y 1000ml.
- * Vaso de precipitados de 100ml, 250ml, 1000ml y 2000ml.
- * Agitador de vidrio y magnético.
- * Espátula.
- * Asa bacteriológica.
- * Hisopos de algodón estériles.
- * Vaso de acero inoxidable.
- * Cajas petri.

2 Equipo.

- > Balanza granataria y analítica.
- Potenciómetro.
- Placa de agitación y calentamiento.
- Mechero bunsen.
- Autoclave.
- Incubadora de 37-35°C.

Soluciones.

- Solución buffer de fosfatos stock a pH 7.2 ± 0.2
- Solución buffer de fosfatos diluida a pH 7.2 ± 0.2
- Solución neutralizador (28% → 280ml de tween 80 + 1.25ml de solución buffer ck/1l)
- Hipoclorito de sodio (2%)
- Alcohol bencílico (2%)
- Dióxido de cloro (1%)
- al cuaternaria de amonio → Active. Cloruro de alquil, dimetil, bencil amonio (745ppm)
Cloruro de benzalconio 0.1%.
- Reactivos para tinción de Gram.

1.4 Cepas.

	ATCC
• <i>Staphylococcus aureus</i>	6538
• <i>Bacillus subtilis</i>	6633
• <i>Enterobacter cloacae</i>	13047
• <i>Escherichia coli</i>	10536
• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35032
• <i>Burkholderia cepacia</i>	25416

1.5 Medios De Cultivo.

- ❖ Caldo nutritivo.
- ❖ Agar Métodos Estándar (AME).
- ❖ Agar Soya Trypticaseína (AST).

2. Metodología.

2.1 Prueba A: Método de efectividad del sanitizante.

2.1.1 Enriquecimiento de cepas.

Cepas. E. coli ATCC 10536 S. aureus ATCC 6538

PROCEDIMIENTO.

1. Sanitice el área de trabajo con el desinfectante en turno.
2. Encienda el mechero bunsen.
3. Tome una asada abundante de la cepa en uso de E. coli y transfírela a un tubo de ensaye de 13x100 que contenga 5ml de caldo nutritivo estéril.
4. Incube a 35-37°C / 24 hrs.
5. Repita los pasos anteriores para S. aureus

2.1.2 Diluciones de cada cepa.

Cepas. E. coli ATCC 10536 S. aureus ATCC 6538

PROCEDIMIENTO.

Tome 1ml de la suspensión enriquecida de E. coli y transfírela a un tubo de ensaye con 9ml de solución buffer de fosfatos a pH 7.2 ± 0.2 .

Del tubo anterior tome 1ml y páselo a otro tubo de ensaye con 9ml de solución Buffer, repetir así sucesivamente hasta obtener una dilución de 1×10^{-8} .

Realice la cuenta microbiana a partir de la dilución 1×10^{-4} - 1×10^{-8} , por vaciado en placa y por triplicado.

- Transfiera 1ml de la dilución 1×10^{-4} a una caja petri por triplicado.
- Adicione a cada caja 15-20ml de AME e incubar a 35-37°C/24-48hrs.
- Transcurrida la incubación cuente el número de UFC/ml de cada caja y sacar promedio.
- Repita lo anterior para cada dilución.

Repita los pasos anteriores para S. aureus.

2.1.3 Prueba de Efectividad del Sanitizante.

1. Seleccione el tubo con la dilución entre $75-125 \times 10^{-6}$ UFC./ml.
2. Por duplicado, mida 99ml de cada una de las soluciones sanitizantes a la concentración de uso en un matraz de 125ml.
3. También prepare por duplicado, 99ml de solución buffer de fosfatos estéril en matraces de 125ml.
4. A cada matraz adicione 1ml de la suspensión de microorganismos (*E. coli* y *S. aureus*).
5. Mezcle y manténgalos durante 30 seg.
6. MUESTRA DEL SANITIZANTE.
 - Tome 1ml de la mezcla anterior y transfíralo a un tubo con 9ml de solución del neutralizador, a ambos matraces de muestra.
 - Agite y transfiera cuatro alícuotas de 1ml y cuatro de 0.1ml a cajas petri estériles.
7. CONTROL (+).
 - Transfiera 1ml de la mezcla inicial a un matraz con 99ml de solución buffer fosfatos esteril (dilución 1); agitar.
 - Tome 1ml de la dilución 1 y transfíralo a un tubo de ensayo con 9ml de solución buffer y agitar, (dilución 2).
 - De la dilución 2 transfiera 1ml a otro tubo de ensayo con 9ml de buffer de fosfatos, agitar (dilución 3).
 - Tome de la dilución 3, cuatro alícuotas de 1ml y cuatro de 0.1ml a cajas petri estériles.

CONTROLES (-).

Neutralizador : Transfiera 1ml de neutralizador estéril a una caja petri.

Solución buffer : Transfiera 1ml de solución buffer a una caja petri.

A cada una de las cajas adicione de 15 a 20ml de AME previamente enfriado a 45-50°C, homogenice y deje solidificar.

(para los controles 25ml neutralizador / 1lt. de AME).

Incube a 35-37°C/48 hrs.

Cuente las UFC/ml de cada caja, sacar promedio y calcular el % de reducción.

Límite: 99.999% / 30seg.

Identifique a *E. coli* y *S. aureus* por observación microscópica.

Sanitizantes:

- Alcohol bencílico / etanol 2%.
- Hipoclorito de sodio 2%.
- Sal cuaternaria de amonio (Active: Cloruro de alquil dimetil, bencil amonio).
- Dióxido de cloro 1%.

2.2 Prueba B: Método de verificación de la confiabilidad del recobro microbiano.

2.2.1 Enriquecimiento de cepas.

Cepas.	<u><i>Pseudomonas aeruginosa.</i></u>	ATCC	35032
	<u><i>Enterobacter cloacae.</i></u>	ATCC	13047
	<u><i>Bacillus subtilis.</i></u>	ATCC	6633

PROCEDIMIENTO.

5. Sanitice el área de trabajo con el desinfectante en turno.
7. Encienda el mechero bunsen.
3. Tome una asada abundante de la cepa en uso de *E. cloacae* y transfírela a un tubo de ensaye de 13x100 que contenga 5ml de caldo nutritivo estéril.
1. Incube a 35-37°C / 24 hrs.
0. Repita los pasos anteriores para las demás cepas.

2.2 Diluciones de cada cepa.

cepas.	<u><i>Pseudomonas aeruginosa.</i></u>	ATCC	35032
	<u><i>Enterobacter cloacae.</i></u>	ATCC	13047
	<u><i>Bacillus subtilis.</i></u>	ATCC	6633

PROCEDIMIENTO.

Tome 1ml de la suspensión enriquecida de *E. cloacae* y transfírela a un tubo de ensaye con 9ml de solución buffer de fosfatos a pH 7.2 ± 0.2 .

Del tubo anterior tome 1ml y páselo a otro tubo de ensaye con 9ml de solución buffer, repítir así sucesivamente hasta obtener una dilución de 1×10^{-8} .

Realice la cuenta microbiana a partir de la dilución 1×10^{-4} - 1×10^{-8} , por vaciado en placa y triplicado.

- Transfiera 1ml de la dilución 1×10^{-4} a una caja petri por triplicado.
- Adicione a cada caja 15-20ml de AME e incubar a 35-37°C/24-48hrs.
- Transcurrida la incubación cuente las UFC/ml de cada caja y calcule el promedio.
- Repita lo anterior para cada dilución.

Repita los pasos anteriores para el resto de los microorganismos a prueba.

2.2.3 Prueba de recobro microbiano.

1. Sanitice el área de trabajo con alcohol 70%.
2. En un vaso de acero inoxidable distribuya 0.1ml de una suspensión de *E. cloacae* a una concentración de 1000UFC/ml.
3. Deje en contacto a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Transcurrido el tiempo, realice el **muestreo de limpieza**:
 - I. Tome un hisopo de algodón estéril e introdúzcalo en un tubo de ensaye que contenga solución buffer de fosfatos pH 7.0 ± 0.2 .
 - II. Retire el hisopo de la solución buffer de fosfatos, eliminando el exceso de la solución oprimiéndolo contra las paredes del tubo de ensaye, y tape el tubo.
 - III. Con la punta húmeda del hisopo, realice un lavado de arrastre sobre la superficie del vaso de acero inoxidable.
 - IV. Enjuague el hisopo nuevamente con la solución buffer de fosfatos de 3 a 5 veces y deséchelo, asegurándose de que se haya eliminado el exceso de solución del hisopo.
5. Analice el contenido del tubo con solución buffer, mediante el método de vaciado en placa para obtener la cuenta de UFC/ml:
 - I. Tome 1ml del tubo con la solución buffer y sembralo en una caja petri estéril. Realícelo por triplicado.
 - II. Adicione de 15 a 20ml de Agar Soya Tripticaseína, previamente fundido y enfriado a 45°C.
 - III. Homogenice la muestra con movimientos rotatorios y deje solidificar a temperatura ambiente.
 - IV. Incube durante 24-48hrs / 35-37°C.
 - V. Transcurrido el periodo de incubación, cuente el número de colonias desarrolladas en cada caja y hacer un promedio de los resultados para reportar el número de UFC/ml de muestra.

➤ Si no se observa crecimiento, reporte como < 10 UFC/ml

➤ El testigo: coloque 1ml de diluyente o solución estéril y proceda como la muestra.

6. Repita los pasos del 2 al 5 para los siguientes microorganismos:

a) <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	ATCC	35032
b) <i>Enterobacter cloacae.</i>	ATCC	13047
c) <i>Bacillus subtilis.</i>	ATCC	6633

3. Evaluación in - vitro de los sanitizantes.

3.1 Enriquecimiento de cepas.

Cepas.	<u>Burkholderia cepacia</u>	ATCC	25416
	<u>Enterobacter cloacae</u>	ATCC	13047
	<u>Pseudomonas aeruginosa.</u>	ATCC	35032

PROCEDIMIENTO.

1. Sanitice el área de trabajo con el desinfectante en turno.
2. Encienda el mechero bunsen.
3. Tome una asada abundante de la cepa en uso de P. aeruginosa y transferirla a un tubo de ensaye de 13x100 que contenga 5ml de caldo nutritivo estéril.
4. Incube a 35-37°C / 24 hrs.

3.2 Diluciones de cada cepa.

Cepas.	<u>Burkholderia cepacia</u>	ATCC	25416
	<u>Enterobacter cloacae</u>	ATCC	13047
	<u>Pseudomonas aeruginosa.</u>	ATCC	35032

PROCEDIMIENTO.

1. Tome 1ml de la suspensión enriquecida de P. aeruginosa y transferirla a un tubo de ensaye con 9ml de solución buffer de fosfatos a pH 7.2 ± 0.2 .
2. Del tubo anterior tome 1ml y pésele a otro tubo de ensaye con 9ml de solución Buffer, repetir así sucesivamente hasta obtener una dilución de 1×10^{-8} .
3. Realice la cuenta microbiana a partir de la dilución 1×10^{-4} - 1×10^{-8} , por vaciado en placa y triplicado.
 - I. Transfiera 1ml de la dil. 1×10^{-4} a una caja petri por triplicado.
 - II. Adicione a cada caja 15-20ml de AME e incubar a 35-37°C/24-48hrs.
 - III. Transcurrida la incubación cuente las UFC/ml de cada caja y scálcule el promedio.
 - IV. Repita lo anterior para cada dilución.

3. Prueba. in - vitro de los sanitizantes

1. Sanitice el área de trabajo con alcohol 70%.
2. En un vaso de acero inoxidable distribuya 0.1ml de una suspensión de P. aeruginosa a una concentración > a 1000UFC/ml.
3. Deje en contacto a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4. Una vez transcurrido el tiempo, adicione 5ml de solución desinfectante y deje reposar por 10 a 15 minutos.
5. Tome 1ml del sanitizante y transfíralo a un tubo de ensayo con 9ml de solución neutralizante y agite (muestra para evaluar la acción del sanitizante).
6. Posteriormente enjuague con 5ml de agua estéril, y siembre todo el volumen en una caja de petri estéril; dejando secar a temperatura ambiente el vaso de acero inoxidable por 3 minutos.
7. Realice el **muestreo de limpieza**:
 - I. Tome un hisopo de algodón estéril e introdúzcalo en un tubo de ensayo que contenga solución buffer de fosfatos pH 7.0 ± 0.2 .
 - II. Retire el hisopo de la solución buffer de fosfatos, eliminando el exceso de la solución oprimiéndolo contra las paredes del tubo de ensayo, y tape el tubo.
 - III. Con la punta húmeda del hisopo, realice un lavado de arrastre sobre la superficie del vaso de acero inoxidable.
 - IV. Enjuague el hisopo nuevamente con la solución buffer de fosfatos de 3 a 5 veces y deséchelo, asegurándose de que se haya eliminado el exceso de solución del hisopo.
8. Analice el contenido del tubo con la solución del neutralizador y la solución buffer de la limpieza, mediante el método de vaciado en placa para obtener la cuenta de UFC/ml:
 - I. Tome 1ml del tubo con la solución buffer y siembrela en una caja petri estéril. Realice por triplicado.
 - II. Adicione de 15 a 20ml de Agar Soya Tripticaseína, previamente fundido y enfriado a 45°C .
 - III. Homogenice la muestra con movimientos rotatorios y deje solidificar a temperatura ambiente.
 - IV. Incube durante 24-48hrs / $35-37^{\circ}\text{C}$.
 - V. Transcurrido el periodo de incubación, cuente el número de colonias desarrolladas en cada caja y calcule un promedio de los resultados para reportar el número de UFC/ml de muestra.
9. Repita a partir del paso 2, para *Enterobacter cloacae* y *B. cepacia*.
 - Si no se observa crecimiento, reporte como < 10 UFC/ml
 - El testigo: coloque 1ml de diluyente o solución estéril y proceda como la muestra.

Sanitizantes:

- Alcohol bencílico / etanol 2%
- Hipoclorito de sodio 2%
- Sal cuaternaria de amonio (Cloruro de benzalconio 0.1%).
- Dióxido de cloro 1%

II. RESULTADO.

A continuación se muestra en las siguientes tablas los datos recopilados retrospectivamente del análisis microbiológico realizados en:

A. Producto (granel y terminado) del área de líquidos no estériles.

(Ver anexo I).

Límite de referencia: < 10 UFC / ml (no patógenos).

bacterias H: hongos P: *Pseudomonas aeruginosa*

AREA DE TERMINADO	FORMA FARMACÉUTICA	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	Nº LOTES	B	H	P
Área 1	Emulsión	18/01/98 - 30/12/98	56	< 10	0	-
			3	< 10	0	+
			10	≥ 10- 50	0	-
			2	40 - 62	0	+
			1	140	0	-
			11	103 -960	0	+
			6	1440-5200	0	+
			2	13760-15200	0	-
			5	10040-33340	0	+
		1	1350	0	+ **	
		04/01/00 - 30/06/00	369	<10		
			3	15 - 35		

B. *cepacia*

AREA DE TERMINADO	FORMA FARMACÉUTICA	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	Nº LOTES	B	H	P	
Área 2	Jarabe	18/01/98 - 30/12/98	51	< 10	0	-	
			19	15 - 90	0	-	
			3	20 - 80	5	-	
			2	40 - 50	10	-	
			1	200	0	-	
			04/01/00 - 30/06/00	23	< 10	0	-
				19	≥ 10 - 30	0	-
				14	105 - 614	0	-
			Suspensión	Antiinflamatoria	18/01/98 - 30/12/98	55	< 10
	1	< 10				5	-
	5	≥ 10 - 100				0	-
	38	≥ 10 - 95				5	-
				22	115 - 657	0	-
1				2320	0	-	

LÍNEA DE LLENADO	FORMA FARMACÉUTICA	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	Nº LOTES	B	H	P
Línea 2		04/01/00 - 30/06/00	80	< 10	0	-
			1	<10	5	0
			13	≥ 10 - 40	0	-
	Suspensión	18/01/98 - 30/12/98	32	< 10	0	-
	Antidiarreica		1	<10	5	-
			5	≥ 10 - 20	0	-
		04/01/00 - 30/06/00	39	< 10	0	-
	Solución	18/01/98 - 30/12/98	15	< 10	0	-
	Analgésica		11	≥ 10 - 100	0	-
			10	105 - 680	0	-
			2	680 y 870	10	-
		04/01/00 - 30/06/00	76	< 10	0	-
			9	≥ 10 - 100	0	-
			17	110 - 500	0	-

LÍNEA DE LLENADO	FORMA FARMACÉUTICA	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	Nº LOTES	B	H	P
Línea 3	Solución	18/01/98 - 30/12/98	22	<10	0	-
	Hipotensiva	04/01/00 - 30/06/00	40	<10	0	-
	Suspensión	18/01/98 - 30/12/98	78	<10	0	-
	Antihelmítica		7	≥10 - 85	0	-
		04/01/00 - 30/06/00	117	<10	0	-
			4	≥10 - 65	0	-

B. Agua de la sanitización de tuberías de llenado. (Ver anexo IV).

Límite de referencia : < 100 UFC / ml

B: bacterias H: hongos

LÍNEA DE LLENADO	FORMA FARMACÉUTICA	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	N ° LOTES	RESULTADO (UFC/ml)
Línea 1	Emulsión	12/01/99 - 28/12/99	88	<10
			1	10
		10/01/00 - 28/06/00	48	<10

LÍNEA DE LLENADO	FORMA FARMACÉUTICA	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	N ° LOTES	RESULTADO (UFC/ml)
Línea 2	Jarabe antitusivo	13/01/99 - 28/12/99	33	<10
			7	≥10 - 35
		04/01/00 - 02/03/00	8	<10
	Suspensión	19/01/99 - 16/12/99	13	<10
	Antiinflamatoria		2	>10 - 15
		13/01/00 - 29/06/00	6	<10
	Suspensión antidiarreica	09/02/99 - 03/11/99	9	<10
		06/01/00 - 29/05/00	8	<10
	Solución analgésica	22/07/99 - 02/12/99	4	<10
			1	28
		18/01/00 - 15/05/00	9	<10
	Gotas analgésicas	02/08/99 - 09/11/99	2	<10
			1	19
		03/02/00 - 17/06/00	4	<10

LÍNEA DE LLENADO	FORMA FARMACÉUTICA	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	N ° LOTES	RESULTADO (UFC/ml)
Línea 3	Solución hipotensiva	19/01/99 - 15/11/99	8	<10
			1	20
		18/01/00 - 28/06/00	6	<10
	Suspensión antihelmítica	22/02/99 - 13/12/99	14	<10
		11/01/00 - 22/06/00	15	<10

C. En la verificación de la limpieza y sanitización de equipos.

(Ver anexo II).

Límite de referencia: $\leq 80\text{UFC} / 50\text{cm}^2$

B: bacterias **H:** hongos

ÁREA DE FABRICACION	EQUIPO	CLAVE	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	Nº LOTES	B (UFC/ 50cm ²)	H (UFC/ 50cm ²)
Línea 1	Tanque	L1-186	11/05/99	1	10	0
		L1-187		1	10	0
		L1-223	20/07/99- 15/11/99	8	<10	0
				7	$\geq 10 - 30$	0
			07/04/00- 28/06/00	9	≤ 10	0
		L1-224	08/09/99- 09/11/99	2	<10	0
				7	$\geq 10 - 40$	0
			25/04/00- 29/06/00	10	<10	0
		L1-225	02/08/99- 09/11/99	7	<10	0
				9	$\geq 10 - 40$	0
	M. Met.	s/n	10/08/99- 25/08/99	2	≤ 10	0
				1	60	
	T 350lts.	s/n	25/08/99- 22/09/99	3	$\geq 10 - 60$	0
			25/04/00- 29/06/00	14	<10	0

ÁREA DE FABRICACION	EQUIPO	CLAVE	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	Nº LOTES	B (UFC/ 50cm ²)	H (UFC/ 50cm ²)
Línea 2	Tanque	L2-226	17/05/99- 22/12/99	12	<10	0
				3	$\geq 10 - 15$	0
		L2-227	17/05/99- 22/12/99	18	<10	0
				5	<10	1
				4	$\geq 10 - 40$	0
		L2-228	17/05/99- 22/12/99	15	<10	0
			3	<10	1	
			1	10	1	
			3	$\geq 10 - 28$	0	

ÁREA DE FABRICACION	EQUIPO	CLAVE	PERÍODO DE RECOPIACIÓN	Nº LOTES	B (UFC/ 50cm ²)	H (UFC/ 50cm ²)
Línea 3	Tanque E	s/n	25/08/99- 14/12/99	2	<10	0
				4	≥10- 40	0
	M. Met.	s/n	02/09/99- 14/12/99	2	<10	0
				2	≥10- 35	0
	T. 200lts.	J1-195	02/09/99- 30/09/99	2	10	0
	T. 350lts.	s/n	30/09/99- 01/12/99	3	≤10	0
	T. 500lts.	s/n	14/12/99	1	0	0
	Tanque	L3-330	19/05/99- 15/12/99	32	<0	0
				16	≥10- 30	0
				23	<10	0
	L3-331	20/05/99- 15/12/99	32	2	<10	0
				11	<10	<2
				18	10	0
				03/04/00- 28/06/00	<10	0
	L3-332	19/05/99- 15/12/99	31	1	<10	0
				12	<10	2
				23	≥10- 40	0
				03/04/00- 28/06/00	<10	0
	L3-333	17/05/99- 15/12/99	41	1	<10	0
				4	<10	2
				24	≥10- 30	0
				03/04/00- 28/06/00	<10	0
	BW	s/n	17/05/99- 15/12/99	38	<10	0
				1	<10	2
				5	10	0
				03/04/00- 28/06/00	<10	0

2. Resultado de la prueba de efectividad del sanitizante.

Se presentan los resultados obtenidos del % de reducción de los sanitizantes probados ante *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Sanitizantes.

A : Alcohol bencílico / etílico 2%.

B : Alcohol bencílico 2%.

C : Hipoclorito 2%.

D : Sal cuaternaria (active: Cloruro de alquil dimetil, bencil amonio al 20%).

E : Dióxido de cloro 1%.

De acuerdo a la bibliografía para considerar validos los resultados, deberá haber una reducción del 99.999% en la cuenta de número de microorganismos en 30 segundos. Ver anexo V.

Staphylococcus aureus

SANITIZANTES	UFC/ml	% de REDUCCIÓN
A	0	100
B	0	100
C	1	99.9999
D	0	100
E	0	100
CONTROLES		
(+)	157.9x10 ⁶	
(-) SB	0	
N	0	
Ambiental	0	
Concentración de inculo	108.6x10 ⁶	

Control (-).

SB : Solución Buffer pH 7.2 ± 0.2

N . Solución neutralizante

Escherichia coli

SANITIZANTES	UFC/ml	% de REDUCCIÓN
A	0	100
B	65	99.9999
C	0	100
D	0	100
E	0	100
CONTROLES		
(+)	205.9x10 ⁶	
(-) SB	0	
N	0	
Ambiental	0	
Concentración de inóculo	214.6x10 ⁶	

Control (-)

SB : Solución Buffer pH 7.2 ± 0.2.

N : Solución neutralizante.

3. Resultado de la verificación del recobro microbiano.

A continuación se presentan tablas con el % de recobro y las características macro y microscópicas, así, como las pruebas bioquímicas de la identificación de las bacterias (*B. subtilis*, *E. cloacae* y *Ps. aeruginosa*) utilizadas para el recobro microbiano.

El recobro microbiano se efectuó utilizando hisopo con punta de algodón, bajo las siguientes características de incubación: 37°C / 24 hr. en Agar Métodos Estándar (AME) como medio de cultivo.

Bacillus subtilis

Nº de Repetición	% de Recobro
1	106.4
2	114.8
3	110.8

$$X = 110.6\%$$

Identificación Macroscópica:

Característica	Observación
Tamaño	1.0-1.5mm
Color	Beige claro
Forma	Circular
Borde	Irregular
Superficie	Plana
Luz transmitida	Opaca
Luz reflejante	Mate
Consistencia	Cremosa

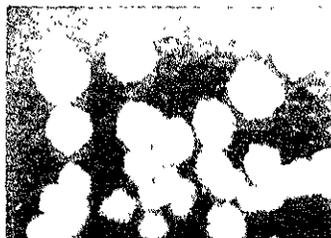


Foto : Colonias de *B. subtilis* obtenidas del recobro microbiano a 37°C/24hrs en AME.

Identificación Microscópica:

Tinción de Gram

Característica	Observación
Tipo de Gram	+
Morfología	Bacilos
Distribución	Individual y en grupos de cadenas cortas

Identificación Bioquímicamente:

BBL CRYSTAL Gram-Positive ID System / GP 20000 4.1.1

Identificación de Gram + Colonias beige, 1-1.5 mm

Características: **BACILLUS**, **ALBUS**, **PLANUS**, **OPACA**, **CRESCENS**.

Colonia: **subtilis**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
77	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Bacillus subtilis

Foto : Lectura de la prueba bioquímica para la identificación del *B. subtilis*

Bacillus subtilis

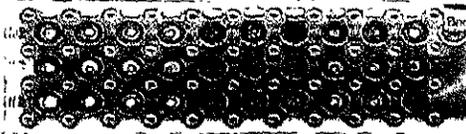


Foto : Kit de prueba bioquímica del *B. subtilis* mediante el sistema BBL CRYSTAL de identificación para Gram +

Enterobacter cloacae

Nº de Repetición	% de Recobro
1	81.4
2	77.2
3	79.5

$X = 79.3\%$

Identificación Macroscópica:

Característica	Observación
Tamaño	0.5-1.0mm
Color	Blanca
Forma	Circular
Borde	Regular
Superficie	Concava
Luz transmitida	Opaca
Luz reflejante	Brillosa
Consistencia	Cremosa

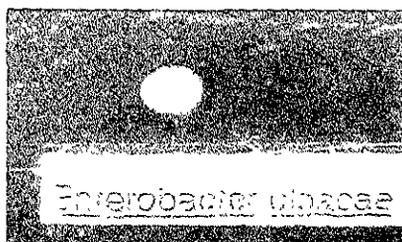


Foto : Colonias de *E. cloacae* obtenidas del recobro microbiano a 37°C/24hrs en AME.

Identificación Microscópica:

Tinción de Gram

Característica	Observación
Tipo de Gram	-
Morfología	Bacilos
Distribución	Colonias individuales

Identificación Bioquímicamente:

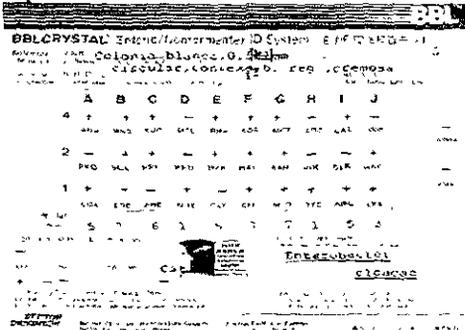


Foto : Lectura de la prueba bioquímica para la identificación del *E. cloacae*

Enterobacter cloacae

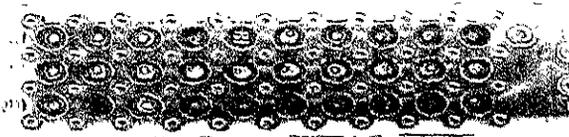


Foto : Kit de prueba bioquímica del *E. cloacae* mediante el sistema BBL CRYSTAL de identificación para Gram -

4. Resultado de la efectividad del sanitizante "in vitro"

Por último se muestran los resultados del % de reducción de los sanitizantes "In vitro" en las siguientes tablas, junto con las concentraciones de inóculo y la identificación macro y microscópicamente del control positivo.

En esta prueba se procuro realizarla bajo las condiciones reales de trabajo tanto en la limpieza y sanitización de los tanques, como en el análisis microbiológico de la muestra. Ver anexos 3 y 4.

Controles negativos:

	UFC
Solución neutralizante →	0
Caldo nutritivo →	0
Agua estéril →	0
Agar Soya Trypticaseína →	0

Microorganismo: *Burkholderia cepacia*

Concentración de inóculo:

Repetición	1 → 1,568,000
	2 → 1,402,500

Sanitizante:	Hipoclorito de Sodio al 2%	UFC / ml	% Reducción
	Repetición:		
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A.S. = Acción de Sanitizante.

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo.

Sanitizante:	Alcohol Bencílico / Etanol al 2%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A.S. = Acción de Sanitizante.

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril.

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo

Sanitizante:	Dióxido de Cloro al 1%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A.S. = Acción de Sanitizante.

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril.

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo.

Sanitizante:	Cloruro de Benzalconio al 0,1%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A.S. = Acción de Sanitizante

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo

Identificación Macroscópica del control positivo:

Característica	Observación
Tamaño	1.0-1.5mm
Color	Beige pigmento verde
Forma	Circular
Borde	Regular
Superficie	Concava
Luz transmitida	Translúcida
Luz reflejante	Brillosa
Consistencia	Cremosa

Identificación Microscópica:

Tinción de Gram colonia del control positivo

Característica	Observación
Tipo de Gram	-
Morfología	Bacilos
Distribución	Grupos de cadenas y en par.

Microorganismo: *Enterobacter cloacae*

Concentración de inculo:

Repetición 1 → 1,248,000
 2 → 986,000

Sanitizante:	Hipoclorito	de	Sodio al 2%
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A.S = Acción de Sanitizante.

E.A.E = Enjuague con Agua Estéril

L.M.H = Limpieza Microbiológica con Hisopo

Sanitizante:	Alcohol Bencílico / Etanol al 2%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H		0	

A.S. = Acción de Sanitizante.

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril.

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo.

Sanitizante:	Dióxido de Cloro al 1%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H		0	

A.S. = Acción de Sanitizante

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril.

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo.

Sanitizante:	Cloruro de Benzalconio al 0.1%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H		0	

A.S. = Acción de Sanitizante.

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril.

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo.

Identificación Macroscópica del control positivo:

Característica	Observación
Tamaño	0.5-1.0mm
Color	Blanca
Forma	Circular
Borde	Regular
Superficie	Concava
Luz transmitida	Opaca
Luz reflejante	Brillosa
Consistencia	Cremosa

Identificación Microscópica:

Tinción de Gram colonia del control positivo

Característica	Observación
Tipo de Gram	-
Morfología	Bacilos
Distribución	Individual.

Microorganismo: *Pseudomonas aeruginosa*

Concentración de inóculo:

Repetición 1 → 1,460000
 2 → 740000

Sanitizante:	Hipoclorito de Sodio al 2%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A S = Acción de Sanitizante.

E A E = Enjuague con Agua Estéril.

L M H = Limpieza Microbiológica con Hisopo.

Sanitizante:	Alcohol Bencilico / Etanol al 2%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		1	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A.S. = Acción de Sanitizante.

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril.

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo.

Sanitizante:	Dióxido de Cloro al 1%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		3	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		1	

A.S. = Acción de Sanitizante

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril.

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo

Sanitizante:	Cloruro de Benzalconio al 0.1%		
	Repetición:	UFC / ml	% Reducción
A. S.	1	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	
A. S.	2	0	100.0
E. A. E.		0	
L. M. H.		0	

A.S. = Acción de Sanitizante.

E.A.E. = Enjuague con Agua Estéril

L.M.H. = Limpieza Microbiológica con Hisopo

Identificación Macroscópica tanto del control positivo como a muestra:

Característica	Observación
Tamaño	1.0-1.5mm
Color	Beige-rosado
Forma	Circular
Borde	Regular
Superficie	Concava
Luz transmitida	Translúcida
Luz reflejante	Brillosa
Consistencia	Cremosa

Identificación Microscópica:

Tinción de Gram a colonia del control positivo y muestra

Característica	Observación
Tipo de Gram	-
Morfología	Bacilos
Distribución	Grupos de cadenas y en par.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

1. **Recopilación retrospectiva del análisis microbiológico realizados en:**
A) Producto, B) Agua de sanitización de tuberías de llenado y C) En la verificación de la limpieza y sanitización de tanques.

A.

Debido a que se obtuvieron algunos lotes de productos no estériles fabricados en el área de líquidos con cuentas microbianas fuera de especificación se realizó la recopilación retrospectiva del análisis microbiológico de los productos tanto a granel como terminado, observándose que los lotes de la emulsión fabricados en la línea 1 principalmente han presentado dichas cuentas bacterianas durante el período comprendido del 18/01/98 al 30/12/98 y por ello se revisó retrospectivamente el análisis microbiológico del agua de sanitización de tuberías de llenado y de la verificación de la limpieza y sanitización de tanques del área de fabricación de líquidos no estériles.

Cabe señalar que en el período del 04/01/00 al 30/06/00 las cuentas microbianas se mantuvieron ≤ 10 UFC/50 cm², debido a que el agua de purificación utilizada en la limpieza y sanitización, como en la fabricación del producto a sido tratada con luz UV y ozono, además de la desionización.

Con respecto a los datos recopilados retrospectivamente de los análisis microbiológicos del agua de sanitización de las tuberías de llenado, observamos que las tuberías no son una fuente de contaminación del producto a granel ó en proceso de llenado; ya que las cuentas bacterianas obtenidas del análisis microbiológico realizadas en el agua de la sanitización de las tuberías no se encuentran fuera de especificación (< 100 UFC/ml), siendo la cuenta más alta de 28 UFC/ml.

De acuerdo a los datos recopilados retrospectivamente del análisis microbiológico realizado a los equipos de fabricación de líquidos, nos muestran que se ha efectuado adecuadamente la sanitización; pues no se obtuvieron cuentas microbianas fuera de los límites especificados (≤ 80 UFC/50cm²) obteniendo como cuenta bacteriana más alta de 60UFC/50cm², eliminando como posible fuente de contaminación.

2. Prueba de la efectividad del sanitizante.

En la evaluación de la efectividad de los sanitizantes, obtuvimos un porcentaje de reducción que oscila entre el 99.9999 - 100% de los sanitizantes a prueba tanto para *Escherichia coli* como para *Staphylococcus aureus*; indicándonos que estos germicidas poseen una efectividad como sanitizante de acuerdo al límite establecido (límite de aceptación $\geq 99.9999\%$ en la reducción del número de microorganismos en 30 segundos) 6

b. Verificación del recobro microbiano.

En la verificación del recobro microbiano utilizando hisopo con punta de algodón, obtuvimos que el recobro para *Bacillus subtilis* es del 110.6%, para *Enterobacter loacae* es del 79.3% y por último, para *Pseudomonas aeruginosa* es de 67.31%.

La variabilidad en cuanto al recobro de cada microorganismo utilizando el hisopo con punta de algodón estéril se debió a que cada bacteria responde de diferente forma ante un cambio a las condiciones óptimas de crecimiento (temperatura, humedad, medio ambiente, requerimientos nutricionales); considerando que la verificación del recobro microbiano es una técnica en la cual se hace una manipulación seriada de los microorganismos, teniendo el riesgo de perder un número de microorganismos, que queden atrapados en la punta de algodón del hisopo, o bien que se mueran en el manipuleo.

De acuerdo a los resultados, observamos que hay un por ciento de error del 25-30% en el recobro de microorganismos con el hisopo con punta de algodón, por lo que se recomienda considerarlo al realizar la técnica.

4. Efectividad del sanitizante "In vitro".

De acuerdo a los resultados obtenidos en la efectividad del sanitizante "In vitro" ante *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa*, observamos que los sanitizantes utilizados en el análisis presentan efectividad sanitizante debido a que presentaron un % de reducción del 100%; recordando que el límite especificado por la AOAC es $\leq 99.9999\%$ de recobro en 30 segundos.

Con respecto a *B. cepacia* y *E. cloacae* se observó un 100% de reducción en todos los sanitizantes utilizados, mientras que para *Ps. aeruginosa* se muestra una mayor efectividad con el hipoclorito de sodio y con el cloruro de benzalconio, ya que en esa concentración de uso se logró reducir el número de microorganismos a cero, obteniéndose así un % de reducción del 100%.

Por otro lado el alcohol bencílico/etanol y con el dióxido de cloro mostraron el % de reducción del 100% con la acción del sanitizante, pero la cuenta microbiana de la limpieza y sanitización fue de 1 y 2 UFC/ml en promedio para el alcohol bencílico y dióxido de cloro respectivamente.

Debe señalarse que para realizar esta prueba se intentó asemejar las condiciones reales del análisis microbiológico para la evaluación de la limpieza y sanitización de los tanques del área de fabricación de líquidos; siendo sustituidos los tanques de acero inoxidable por vasos de precipitados de acero inoxidable (30ml), por lo que se tiene que considerar que los vasos por ser de una dimensión menor se logró muestrear los lugares críticos (ángulos), pero no se pudo evaluar otros puntos críticos de gran importancia como las válvulas, codos y aspás que se encuentran en los tanques de fabricación.

IX. CONCLUSION.

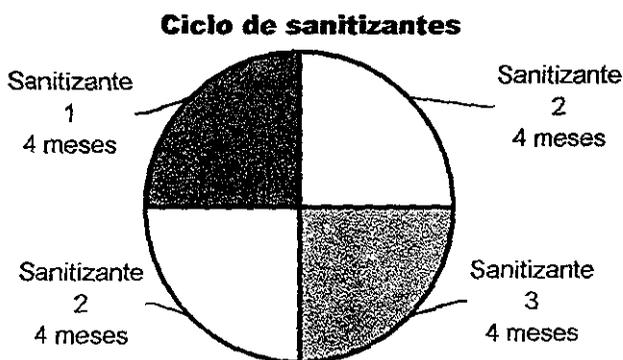
Al evaluar los procedimientos de limpieza y sanitización mediante un estudio retrospectivo de los análisis microbiológicos tanto del agua de la sanitización de tuberías de llenado como de los equipos de fabricación de líquidos; así, como la realización In vitro de los procedimientos de limpieza y sanitización; concluimos que dichos procedimientos son capaces de eliminar la carga microbiana presente al final de los procesos de fabricación y llenado del área de líquidos, evitando una contaminación microbiana de lote a lote o cruzada.

Por otro lado la evaluación de la actividad de los agentes sanitizantes probados nos muestran que los sanitizantes utilizados para realizar la limpieza y sanitización de los tanques y tuberías de llenado son capaces de reducir la carga microbiana, ya que presentaron un % de reducción del 99.999 – 100.00 %, siendo el límite de 99.999% de reducción en 30 segundos.

X. PROPUESTA DEL CICLO DE SANITIZANTES.

Basándose en la clasificación de los sanitizantes tanto de estructura como del mecanismo de acción que presentan los agentes químicos con las bacterias, se propone el siguiente ciclo de sanitizantes:

Los cuatro meses primeros sanitizar los equipos de fabricación del área de líquidos con hipoclorito de sodio (2%) como compuesto clorado; los siguientes cuatro meses con cloruro de benzalconio (0.1%) como sal cuaternaria de amonio, posteriormente cuatro meses con dióxido de cloro (1%) como compuesto clorado y finalmente para cerrar el ciclo, nuevamente con cloruro de benzalconio (0.1%).



- Sanitizante 1 : Hipoclorito de sodio.
- Sanitizante 2 : Cloruro de benzalconio.
- ▨ Sanitizante 3 : Dióxido de cloro.

Cabe señalar que el rol de sanitizantes ha sido propuesto alternando un compuesto clorado y uno cuaternario de amonio, para evitar juntar los dos compuestos clorados, provocando una resistencia bacteriana.

Lo anterior es fundamentado por el mecanismo de acción de los agentes sanitizantes; sabiendo que los compuestos clorados son agentes que modifican los grupos funcionales de las proteínas y los ácidos nucleicos de los microorganismos en contacto con estos. Mientras que los compuestos de sales cuaternarias de amonio son agentes que lesionan la membrana celular; asegurándose así la erradicación bacteriana no deseada.

XI. RECOMENDACIONES.

A pesar de que se comprobó la efectividad sanitizante de cada desinfectante robado; sería recomendable verificar su efectividad periódicamente para asegurar su estabilidad y actividad sanitizante cumpliendo con las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP's).

Se recomienda que el muestreo microbiológico para evaluar la limpieza y sanitización de los tanques; no solo se le realice a los tanques de fabricación, sino que también se muestre los puntos críticos de los mismos tanques de fabricación y de la tubería de llenado como son las espas, codos y válvulas. Mejorando la evaluación de la limpieza y sanitización para un mayor control de calidad hacia los productos fabricados. VER DIAGRAMAS I,II,III DE PUNTOS DE MUESTREO EN CADA LÍNEA.

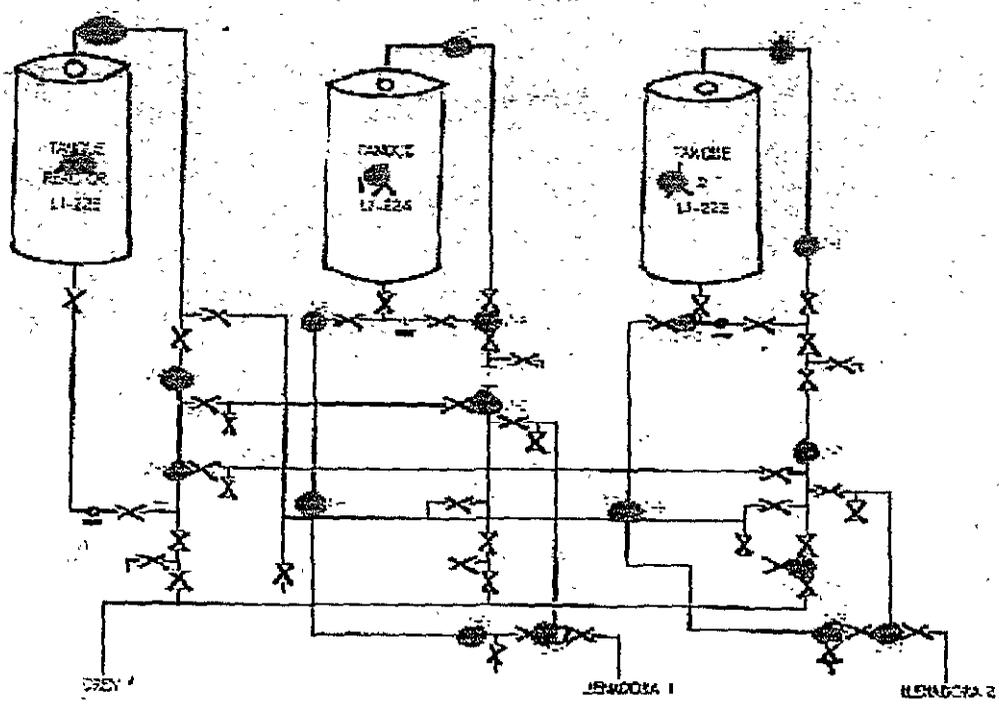
Una alternativa para eliminar los errores tanto del operador y de la técnica en análisis microbiológico de la evaluación de la limpieza y sanitización de los tanques del área de fabricación de líquidos, es el uso de las placas RODAC, ya que por medio de estas se reducen los pasos de la evaluación, y por ende se evita la pérdida de los microorganismos por la manipulación en el seguimiento de los cultivos, además de corregir el error en cuanto al recobro microbiano que representa el uso del hisopo con punta de algodón durante el muestreo.

Aún que los procedimientos de limpieza y sanitización cumplen con las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP's), de acuerdo con la evaluación microbiológica; es necesario implementar un ciclo de sanitizantes con radicales químicos diferentes para disminuir la reincidencia bacteriana, evitando que con el tiempo se presente una resistencia de microorganismos contaminantes.

Debido a que el cloruro de benzalconio tiene una actividad antifúngica limitada, se recomienda que durante el tiempo que es utilizado para sanitizar los equipos adicionar un paso ó mezclar con un compuesto antifúngico para evitar la posible proliferación de hongos resistentes al desinfectante. Cabe señalar que el cloruro de benzalconio se considero en el ciclado de sanitizantes por ser un desinfectante de uso por esta industria farmacéutica.

DIAGRAMA I. TANQUES Y TUBERIA CONDUCTORA DE LLENADO

Línea 1.



Tubería general

⊕
≡
⊖

Bomba

Válvula de tipo mariposa

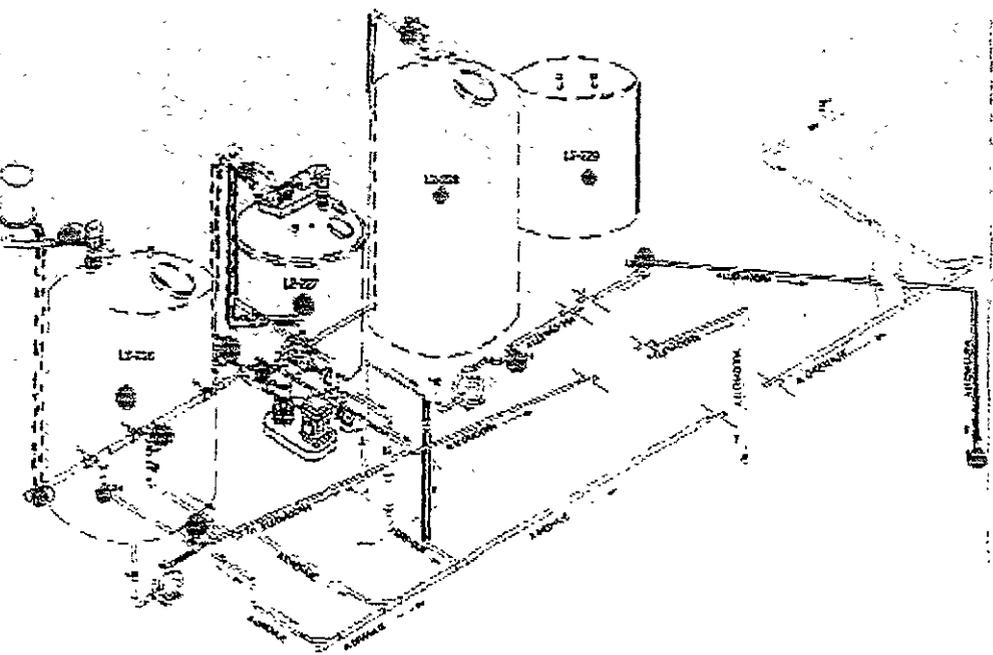
→

Flujo de la línea

Puntos recomendables para realizar un muestreo microbiológico

DIAGRAMA IL TANQUES Y TUBERIA CONDUCTORA DE LLENADO

Línea 2.



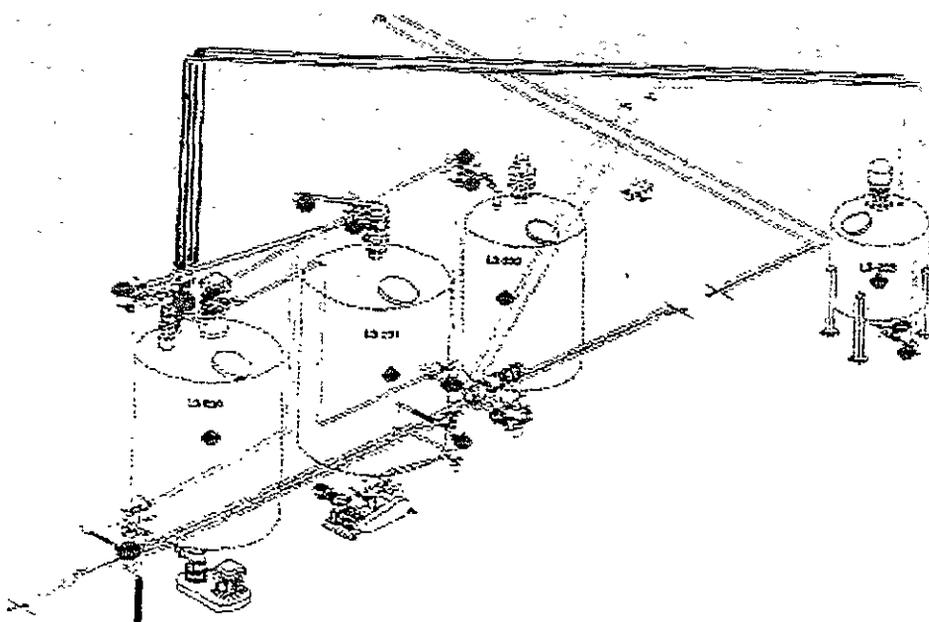
Tubería general

- Flujo de la línea general de proceso
- Línea de drenaje → Línea vacío
- Línea A llenadoras

Puntos recomendables para realizar un muestreo microbiológico

DIAGRAMA III. TANQUES Y TUBERIA CONDUCTORA DE LLENADO

Línea 3.



- Tubería general

Puntos recomendables para realizar un muestreo microbiológico

XII. ANEXO I.

LIMITE MICROBIANO EN MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTO TERMINADO

MÉTODO:

1. Material.

- Algodón.
- Autoclave.
- Asa de platino y porta asa.
- Agitadores de vidrio.
- Baño de agua a 40°C.
- Balanza granataria.
- Cajas petri.
- Horno a 200°C (esterilización).
- Frascos de vidrio de 100ml con tapa de rosca.
- Gradilla .
- Filtros.
- Pinzas pequeñas de disección.
- Membranas de 0.45 micras.
- Jeringas de vidrio 10-20 ml.
- Incubadora a 30-35°C; 25°C.
- Matraces Erlenmeyer de 200 a 500 ml.
- Mechero.
- Pipetas graduadas de 1.0, 5.0 y 10.0 ml.
- Probetas de 50, 100 y 1000 ml.
- Tubos de ensaye con tapas de rosca de 15X150 mm.
- Vasos de precipitados de 500 a 1000 ml.

REACTIVOS: Soluciones y medios de cultivo.

- Telurito de potasio al 1.0%.
- Solución yodo - yodurada.
- Acido tartárico al 10.0% .

- Solución reguladora de fosfato a pH 7.2 ± 0.2 (Buffer).
 - * Solución concentrada.
 - * Solución diluida.
- Solución salina isotónica (SSI).
- Solución verde brillante (dilución 1:1000).
- Solución concentrada de N, N- Dimetil-1 , 4- Fenilendiamino- Dicloruro.
- Reactivo para prueba de coagulasa.

3. MEDIOS DE CULTIVO.

- Caldo lactosado (CL).
- Caldo de soya tripticaseína (TSL).
- Caldo de caseína – soya – lecitina – tween 80 (TSL/T).
- Caldo de selenito – cistina (CSC).
- Caldo de tretationato (CTT).
- Agar Mc Conkey (AMCC).
- Agar verde brillante (AVB).
- Agar de sulfito y bismuto (ASB).
- Agar eosina – azul de metileno (AEM).
- Agar sal manitol (ASM).
- Agar Vogel – Jonson (AVJ).
- Agar Cetrimida (AC).
- Agar soya tripticaseína (TSA).
- Agar dextrosa y papa (ADP).
- Agar salmonella y shigella (ASS).
- Agar dextrosa sabouraud (ADS)

procedimiento.

RUEBA PRELIMINAR : Ayuda a demostrar que bajo las condiciones de prueba, es posible recuperar a los microorganismos control previamente inoculados en la muestra.

La lecitina de soya al 5% y el polisorbato al 20 – 40% son sustancias que inactivan a la mayoría de los preservativos empleados en la industria farmacéutica. Si la recuperación de los microorganismos control es satisfactoria, en los análisis sucesivos del producto empleando los medios antes mencionados; podrán seguirse usando como diluyentes y medios de enriquecimiento para la investigación de microorganismos patógenos.

A pesar de la incorporación de los agentes neutralizantes o el aumento de volumen deluyente, los microorganismos control no se recuperan y la naturaleza del producto no

permite aplicar el método de filtración, se asume que la actividad bactericida del producto no permitirá el desarrollo de las bacterias relacionadas con los microorganismos control probados. Sin embargo, se debe obtener mayor información que permite establecer el espectro de actividad antimicrobiana del producto.

MUESTREO : La muestra de producto para cada determinación no debe ser menor a 10 g ó 10 ml.

PRUEBA. Preparación de la muestra :

De acuerdo a las características físicas de la muestra, se elige el método adecuado para obtener una solución. La dilución corresponde a la primera (10^{-1}) y se hace con solución diluida de fosfatos a pH 7.2, caldo digerido de caseína - soya - lecitina- tween, caldo soya tripticaseína o caldo lactosado.

Sólidos y líquidos miscibles en agua.

Pesar o medir exactamente 10 g ó 10 ml de muestra y transferir a 90 ml del diluyente seleccionado.

Líquidos no miscibles en agua.

Pedir exactamente 10 ml del producto, transferirlo a 90 ml del diluyente seleccionado adicionando tween 80.

Líquidos viscosos.

Para muestras viscosas que no puedan medirse con pipeta en la disolución 1:10, efectuar disoluciones 1:100 o 1: 500.

CUENTA TOTAL DE MICROORGANISMOS MESOFILICOS AEROBIOS : Si las muestras proporcionan una solución suficiente diáfana se emplea el método 1 (cuenta en placa) y en caso contrario se usa el método 2 (filtración con membrana).

Método 1. Cuenta en placa.

Pesar 10 g ó 10 ml de producto o materia prima.

Según sea el caso en un frasco que contenga 90 ml de agar soya tripticaseína (con ó TWEEN 80). Se efectúan las diluciones decimales necesarias para que 1 ml tenga de 30 y 300 UFC/ ml.

3. De cada dilución efectuada se trasvasan 1 ml de la misma a cada una de las cuatro cajas petri estériles marcadas con la referencia y fecha de siembra.

4. Se adicionan de 15 a 20 ml de TSA y se mezcla con movimientos suaves y rotatorio.

5. Se realizan testigos del medio (positivo y negativo):

Se preparan inoculando 1 ml de solución buffer a pH 7.2 estéril a una caja de petri estéril a su vez a cada caja se le adiciona 15 a 20 ml de TSA; y para el testigo positivo dejar la caja abierta durante 15 minutos aproximadamente y para el negativo cerrar de inmediato.

6. Incubar las cajas por 48 hr. / $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Trascurrido el tiempo de incubación se hace el conteo de UFC / caja y se obtiene el promedio y se multiplica por el inverso de la dilución para obtener el número de UFC / g ó ml de muestra.

Si no se observa desarrollo 1:10 expresar los resultados como $< 10\text{UFC} / \text{g} \text{ ó } \text{ml}$ de muestra.

Cuenta de hongos y levaduras.

Pesar 10 g ó 10 ml de producto o materia prima.

Según sea el caso en un frasco que contenga 90 ml de agar soya tripticaseína (con ó sin TWEEN 80).

Inocular cada dilución por duplicado en cajas petri desechables estériles, identificadas con la referencia y fecha de inicio de análisis.

Adicionar de 10 a 15 ml de APD ó ASD y mezclar el contenido de las cajas con movimientos rotatorios. Preparar testigos negativos y positivos como método 1, pero empleando APD ó ASD.

Incubar las placas a temperatura ambiente por 5 a 7 días.

Efectuar el conteo de colonias por placa y obtener el promedio de las mismas y multiplicar por el inverso de la dilución para determinar el número UFC / g ó ml de muestra.

Método 2. Método en tubo – filtración con membrana – NMP (número más probable).

1. Realizar la primera dilución de la muestra (1:10) colocando 10 ml de la muestra en 90ml de solución buffer diluida a pH 7.2.

2. Realizar diluciones decimales de 1: 100 y 1:1000.

3. Identificar 12 tubos con 9ml de TSL formando 4 hileras de tres tubos cada una:
 Marcar la primera hilera con el número 1:10, la segunda 1:100 , la tercera 1:1000 y la cuarta con la letra "A" como testigo.

4. Filtrar por triplicado 1 ml de cada dilución a través de filtros Swinnex, membranas estériles de 0.45 micras y jeringas; empezando con los testigos, seguido de la serie 10^{-3} , después la serie 10^{-2} y por último la serie 10^{-1} .

5. En condiciones asépticas, retirar cada una de las membranas de los filtros con pinzas estériles y depositarlas en los tubos de TSL según corresponda.

6. Identificar los tubos con lote y fecha del análisis e incubarlos a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 48 – 72 horas.

Determinar NMP.

Tabla 1. Determinación de número más probable (NMP)

NÚMERO DE TUBOS		POSITIVOS		NMP de microorganismos para g ó ml de muestra
ó ml de muestra en	ó ml de muestra en	ó ml de muestra en	ó ml de muestra en	
"100" (0.1mg ó ml)	"10" (0.1mg ó ml)	"1" (0.1mg ó ml)	"1" (0.1mg ó ml)	
3	3	3		≥ 1100
3	3	2		1100
3	3	1		500
3	3	0		200
3	2	3		290
3	2	2		210
3	2	1		150
3	2	0		90
3	1	3		160
3	1	2		120
3	1	1		70
3	1	0		40
3	0	3		95
3	0	2		60
3	0	1		40
3	0	0		23

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATOGENOS.

Tabla 2: Características morfológicas de los microorganismos en medios de cultivo

MICROORGANISMOS	MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGIA COLONIAL	TINCIÓN DE GRAM	PRUEBAS DE CONFORMIDAD
<i>Escherichia coli</i>	Agar Mac Conkey	Colonias grandes de color rosas-rojas; rodeadas de zona de precipitación.	Bacilos negativos	Fermentación de azúcar y producción de gas (+)
	Agar Levine-cosina-azul de metileno	Colonias pequeñas azul-negro en la parte central, con brillo metálico verdoso.	Bacilos negativos	
<i>Salmonella sp.</i>	Agar verde brillante	Colonias pequeñas transparentes incoloras rosas o blancas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja	Bacilos negativos	TSI. picadura amarilla con negro, superficie roja
	Agar Xilosa-lisina desoxicolato	Colonias rojas con o sin negro, no modifican el medio	Bacilos negativos	
	Agar sulfito bismuto	Colonias verdes o negras con brillo metálico	Bacilos negativos	
	Agar hierro triple azúcar	Superficie alcalina (roja) picadura ácida (amarilla) con o sin producción de H ₂ S (negro) Bacilos negativos		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar cetrinida	Colonias verdes azulosas, con luz UV se observan fluorescentes	Bacilos negativos	Oxidasa (+)
	Agar Pseudomonas para detectar fluoresceína	Colonias incoloras o amarillentas, con luz UV se observan amarillas fluorescentes	Bacilos negativos	Oxidasa (+)
	Agar para detectar picroanina	Colonias verde-azulosas, con luz UV son azul fluorescente	Bacilos negativos	Oxidasa (+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Vogel Johnson	Colonias negras rodeadas de una zona amarilla	Cocos positivos en racimos	Cosgulasa (+)
	Agar sal manitol	Colonias amarillas rodeadas de una zona amarilla	Cocos positivos en racimos	Cosgulasa (+)
	Agar Baird Parker	Colonias negras lustrosas rodeadas de zonas claras	Cocos positivos en racimos	

III. ANEXO II.

LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN DE LOS TANQUES DE FABRICACIÓN DEL ÁREA DE LÍQUIDOS.

MÉTODO:

Reactivos y Material

Tela sintética o manta de cielo.
Olla de acero inoxidable.
Manguera de plástico reforzado.
Máquina hidrolavadora modelo 200 F .
Solución de hipoclorito de sodio al 13%.
Solución de dióxido de cloro al 1%
Solución cloruro de benzalconio al .
Solución de alcohol bencílico al 2%
Agua potable
Agua purificada
Escobillón de cerdas de plástico o nylon redondo y de mango.
Jabón (turco azul / ecolab).

personal debe portar.

Uniforme de algodón, cofia, guantes de hule, botas de hule, careta y mandil.

Procedimiento.

etapa 1

Realizar un enjuague del tanque con agua potable.

Lavar el tanque con jabón .

Enjuagar nuevamente con agua potable

Preparar en una olla de acero inoxidable una solución del desinfectante en turno

Conectar la manguera de productos químicos a la hidrolavadora y el otro extremo a la de acero inoxidable.

Conectar la hidrolavadora a la energía eléctrica.

Abrir la llave de productos químicos y encender la hidrolavadora.

Enjuagar todo el interior del tanque, dispersor y válvulas con la solución sinfectorante, activando el paso de la recirculación de 5 a 10 minutos. Desalojar el sinfectorante y mandarlo al cárcamo.

Apagar la hidrolavadora y conectar la manguera de agua purificada a la hidrolavadora.

Abrir la llave de la hidrolavadora y enjuagar todo el tanque y el dispersor con el agua desionizada y recircular durante 5 a 10 minutos; posteriormente parar la recirculación y abrir las válvulas para desalojar el agua.

Lavar con agua a temperatura de 90°C.

Enjuagar con agua desionizada y recircular durante 5 a 10 minutos; posteriormente parar la recirculación y abrir las válvulas para desalojar el agua.

Limpiar el exterior del tanque utilizando una tela sintética con la solución sinfectorante.

Llamar al inspector de aseguramiento de calidad para verificar la limpieza del pozo.

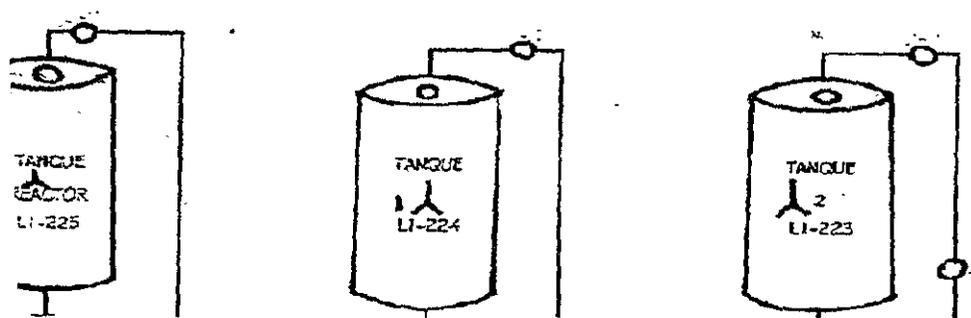


Figura: Tanques de fabricación de líquidos de la línea 1.

Línea 2

1. Realizar un enjuague del tanque con agua potable.
2. Lavar el tanque con jabón .
3. Enjuagar nuevamente con agua potable.
4. Lavar el tanque suministrando vapor sanitario (1Kg/pulg/40min.)
5. Preparar en una olla de acero inoxidable una solución del desinfectante en turno.
6. Conectar la manguera de productos químicos a la hidrolavadora y el otro extremo a la olla de acero inoxidable.
7. Conectar la hidrolavadora a la energía eléctrica.
8. Abrir la llave de productos químicos y encender la hidrolavadora.
9. Enjuagar todo el interior del tanque, dispersor y válvulas con la solución desinfectante, activando el paso de la recirculación de 5 a 10 minutos. Desalojar el desinfectante y mandarlo al cárcamo.
10. Apagar la hidrolavadora y conectar la manguera de agua purificada a la hidrolavadora.
11. Abrir la llave de la hidrolavadora y enjuagar todo el tanque y el dispersor con el agua purificada y recircule durante 5 a 10 minutos; posteriormente parar la recirculación y abrir las válvulas para desalojar el agua.
12. Limpiar el exterior del tanque utilizando una tela sintética con la solución desinfectante.
13. Llamar al inspector de aseguramiento de calidad para verificar la limpieza del tipo.

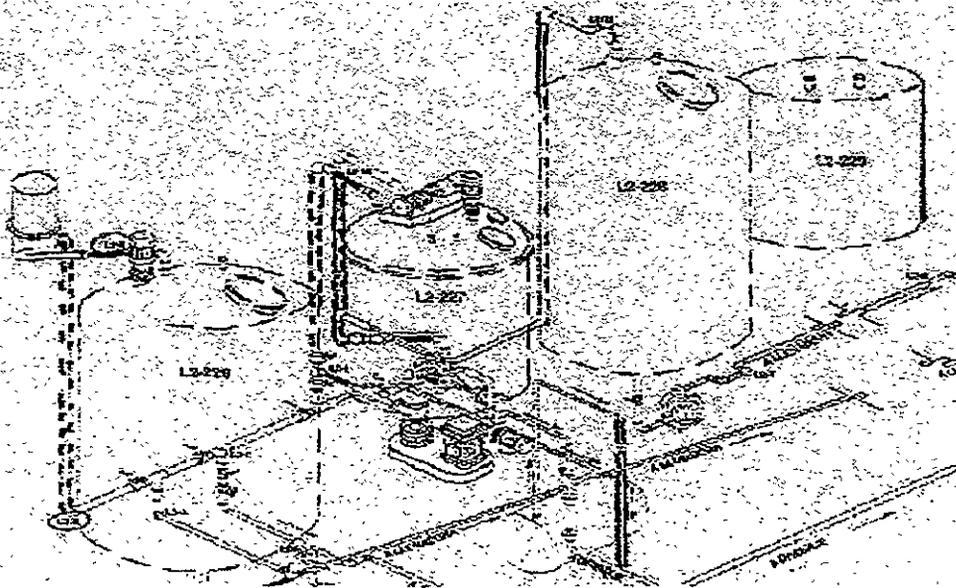


Figura: Tanques de fabricación de líquidos de la línea 2.

Línea 3

1. Realizar un enjuague del tanque con agua potable.
2. Lavar el tanque con jabón .
3. Enjuagar nuevamente con agua potable.
4. Lavar el tanque suministrando vapor sanitario (1Kg/pulg/40min.)
5. Preparar en una olla de acero inoxidable una solución del desinfectante en turno.
6. Conectar la manguera de productos químicos a la hidrolavadora y el otro extremo a la olla de acero inoxidable.
7. Conectar la hidrolavadora a la energía eléctrica.
8. Abrir la llave de productos químicos y encender la hidrolavadora.
9. Enjuagar todo el interior del tanque, dispersor y válvulas con la solución desinfectante, activando el paso de la recirculación de 5 a 10 minutos. Desalojar el desinfectante y mandarlo al cárcamo.
10. Apagar la hidrolavadora y conectar la manguera de agua purificada a la hidrolavadora.
11. Abrir la llave de la hidrolavadora y enjuagar todo el tanque y el dispersor con el agua purificada y recircule durante 5 a 10 minutos; posteriormente parar la recirculación y abrir las válvulas para desalojar el agua.
12. Solicitar a aseguramiento de calidad tomar una muestra para verificar química y microbiológicamente la limpieza.
13. Preparar en una olla de acero inoxidable una solución desinfectante de alcohol metílico al 2%.
14. Abrir la llave de paso de productos químicos y encienda la hidrolavadora.

15. Enjuagar todo el interior del tanque, dispersor y válvulas con la solución desinfectante activando el paso de la recirculación de 5 a 10 minutos y al termino parar la recirculación.

La solución de alcohol bencílico permanecerá en contacto con el tanque hasta que sea utilizado nuevamente (antes de utilizar drenar la solución).

16. Limpiar el exterior del tanque utilizando una tela sintética con la solución desinfectante.

17. Llamar al inspector de aseguramiento de calidad para verificar la limpieza del equipo.

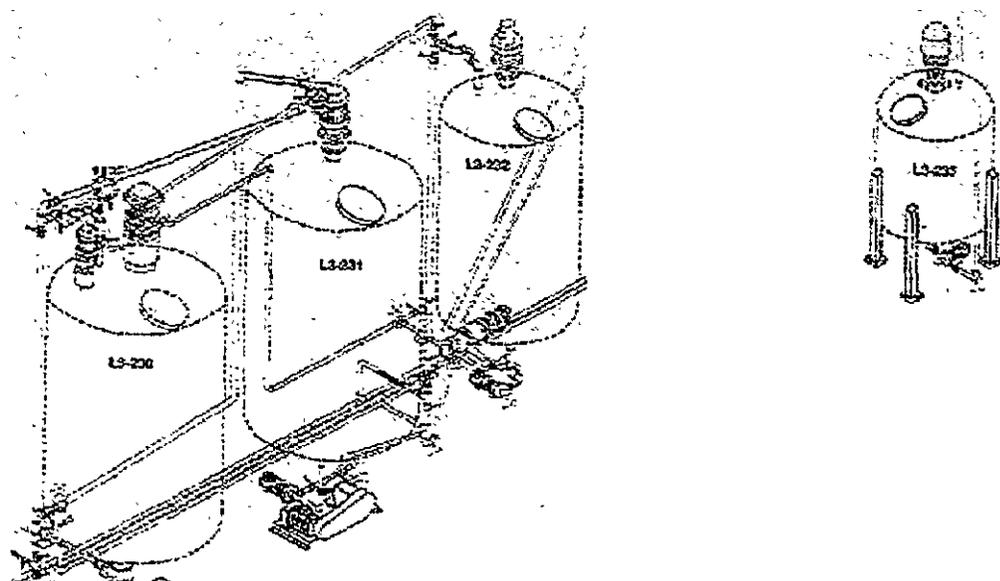


Figura: Tanques de fabricación de líquidos de la línea 3.

IV. ANEXO III.

EVALUACIÓN DE LA LIMPIEZA DE EQUIPOS DE PRODUCCIÓN (ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO).

MÉTODO:

Reactivos y Material

Hisopos estériles.

Tubos con solución buffer estéril (buffer de fosfatos pH 7.2 ± 0.2).

Guantes desechables estériles.

Cajas petri desechables estériles.

Agar Soya Trypticaseína/Tween.

El personal debe portar.

Bata limpia, cubre bocas, cofia y guantes desechables estériles.

Procedimiento.

Utilizar un tubo y un hisopo por cada equipo a muestrear, e identificarlo.

Abrir el tubo e introduzca el hisopo (sin tocar la punta del tubo con los dedos) en el tubo con solución buffer, sacarlo y tape el tubo; con la punta húmeda del hisopo raspar superficie del equipo aproximadamente 50cm^2 (Figura 1) haciéndolo en las zonas más difíciles de lavar" (aspas, ángulos, etc.).

Abrir el tubo e introduzca nuevamente el hisopo agitándolo en la solución y presionar contra la pared del tubo para retirar el exceso de solución, sacar el hisopo y cerrar el tubo.

Analizar el contenido de la solución buffer por el método de vaciado en placa, utilizando Agar soya Trypticaseína./Tween:

Tomar una alícuota de 1ml del tubo con solución buffer y ponerla en una caja petri desechable estéril, hacerlo por duplicado, vaciar el medio de cultivo estéril y sembrarlo aproximadamente a 45°C , homogeneizar las cajas con muestra e incube a 35°C / 24-48hrs.

Al final del periodo de incubación, contar el número de colonias y reporte el número UFC/ml, de cada equipo.

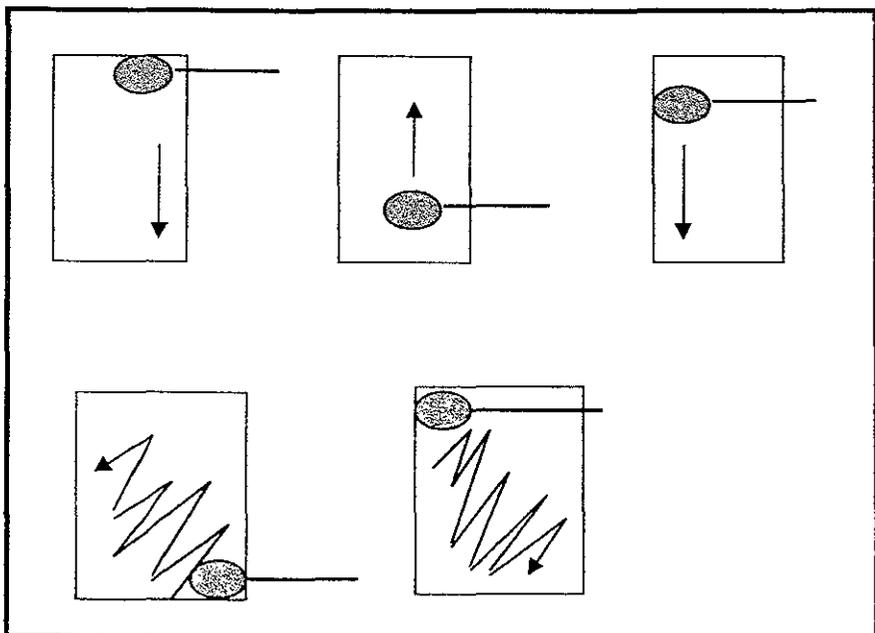


Figura 1. Forma de muestreo de la superficie de los equipos para la limpieza.

V. ANEXO IV.

MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

FILTRACIÓN POR MEMBRANA:

1. Sanitizar el área de trabajo y prender la campana de flujo laminar.
2. Instalar el equipo de filtración.
3. Colocar una membrana de 0.45 micras estéril al filtro.
4. Vaciar los 5ml de muestra y filtrarlo.
5. Desprender la membrana del embudo de filtración y colóquela sobre una placa de Agar Métodos Estándar.
6. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas.
7. Pasado el tiempo de Incubación realizar la cuenta total bacteriana, dividiendo entre 5 para sacar UFC/ml.

VACIADO EN PLACA:

1. Sanitizar el área de trabajo con alcohol 70%.
2. Sembrar 1ml de la muestra de la limpieza, en una caja petri estéril. Realizar por duplicado.
3. Adicionar de 15 a 20ml de Agar Soya Trypticaseína, previamente fundido y enfriado a 45°C .
4. Homogeneizar la muestra con movimientos rotatorios y dejar solidificar a temperatura ambiente.
5. Incubar durante 24-48hrs / $35-37^{\circ}\text{C}$.
6. Transcurrido el periodo de incubación, contar el número de colonias desarrolladas en cada caja y hacer un promedio de los resultados para reportar el número de UFC/ml de muestra.

➤ Si no se observa crecimiento, reportar como < 10 UFC/ml

➤ El testigo consiste en colocar 1ml de diluyente o solución estéril y proceder como la muestra.

XVI. ANEXO V.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES.

MÉTODO:

Acción del Sanitizante y Germicida.

Material.

- * Matraces Erlenmeyer de 250ml.
- * Matraces Erlenmeyer de 100ml.
- * Pipetas graduadas de 1ml con intervalos de 0.1ml.
- * Tubos de ensaye 20X50mm.
- * Cajas petri estériles.
- * Mechero Bunsen.

Medio de cultivo.

Agar Métodos Estándar (Bioxon cat. 134).

Microorganismos de Prueba.

Escherichia coli ATCC 10536.

Staphylococcus aureus ATCC 6538.

Incubados a 24-48hrs.

Suspensión de $75-125 \times 10^6$ m.o./ml (para que el % de reducción sea valido).

Soluciones.

- † Neutralizador.
- † Buffer 0.25M.
- † Buffer diluida.

Procedimiento.

Por duplicado, medir 99ml de solución sanitizante o germicida en la concentración que será usado.

Preparar un matraz con 99ml de solución estéril de buffer de fosfatos diluido.

Adicionar 1ml de suspensión del microorganismo a cada matraz de sanitizantes y control.

Mezclar y mantener durante 30 y 60 segundos después de la adición de la suspensión.

Para las muestras de sanitizante:

A) Transferir 1ml (de cada matraz de bactericidas, conteniendo la suspensión de microorganismos) a un tubo con 9ml de neutralizador.

B) Agitar y transferir 4 alicuotas de 1ml y 4 de 0.1ml a placas petri individuales estériles.

Para el control:

A) Transferir 1ml del matraz con suspensión a un matraz con 99ml de solución buffer de fosfatos estéril, (dilución 1).

B) Agitar y transferir 1ml de la dilución 1 a 99ml de solución buffer y agitar (dil. 2).

C) Transferir 1ml de dil. 2 a 99ml de solución buffer y agitar (dil. 3); de la dil. 3 transferir 4 alicuotas de 1ml y cuatro de 0.1ml a placas petri estériles individuales.

Controles

- Neutralizador: Utilizar un tubo con neutralizador sin abrir.
- Agua : 1ml de cada tipo de agua usada .
- Solución buffer: Utilizar 1ml de soln. Buffer de un tubo o matraz sin abrir.

A todas las placas previamente identificadas, adicionar 15-20 ml de medio de cultivo estéril y enfriado a 45-50°C, homogeneizar y dejar solidificar, incubar a 35°C durante 24 hrs. Para los controles usar el medio indicado para sales cuaternarias de amonio, usar medio adicionando 25ml de neutralizador por cada litro.

Resultados:

Para considerar validos los resultados, deberá haber una reducción del 9999% en la cuenta de número de microorganismos en 30 segundos.

Después del conteo de microorganismos, confirmar que los microorganismos revivientes son *E. coli*, por transferencia a tubos con caldo lactosado y placas con EMB; confirmar *S. aureus* por examinación microscopica.

VI. ANEXO VI.

MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS.

Solución buffer de fosfatos 0.25M.

Disolver en un matraz de 1000ml 34g de fosfato de potasio monobásico en 1000ml de agua destilada, mezclar y aforar con agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 con NaOH 2N. Envasar en recipientes apropiados, esterilizar y almacenar en refrigeración.

Solución buffer de fosfatos diluida.

A) Adicionar 1.25ml de la solución buffer de fosfatos 0.25M a 1 litro de agua purificada, distribuir en porciones de 99ml. Esterilizar 20 minutos/121°C.

B) Diluir 1ml de solución buffer 0.25M en 800ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 , envasar y esterilizar en auto clave a 121°C/15minutos.

Neutralizador.

Mezclar 40g de azolectina y 280ml de polysorbato 80 ó 20 con 1.25ml de buffer de fosfatos 0.25M, diluir a 1 litro de agua purificada y ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 . Esterilizar 20 min. / 121°C.

Hipoclorito de sodio (2%).

Diluir 154ml de hipoclorito de sodio en 1 litro de agua purificada, distribuir en porciones de 99ml.

Alcohol bencílico (2%):

a) Mezclar 280ml de alcohol etílico con 20ml de alcohol bencílico, diluir en 1000ml de agua purificada, distribuir en porciones de 99ml.

b) Diluir 20ml de alcohol bencílico en 980ml de agua purificada, distribuir en porciones de 99ml.

XVIII. ANEXO VII.

MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo pueden ser preparados a partir de los ingredientes o mezclas deshidratadas que se adquieren en el comercio.

Caldo de nutritivo.

El caldo nutritivo es usado para el cultivo de muchas especies de microorganismos no exigentes.

Formulación:

Digerido pancreático de gelatina	5.0g
Extracto de carne de res	3.0
PH final	6.9 ± 0.2

Suspender 8g del polvo en 1 litro de agua purificada, mezclar. Calentar ligeramente, si es necesario para disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C/15 minutos.

Agar Métodos Standard.

El agar métodos standard es usado para obtener placas de cuentas microbianas a partir de leche, productos diarios, comida, agua y otros materiales de importancia sanitaria.

Formulación:

Digerido pancreático de caseína	5.0g
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1.0
Agar	15.0
PH final	7.0 ± 0.1

Suspender 23.5g del polvo en 1 litro de agua purificada, agitar. Calentar con agitación constante y ebullición por 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C/15 minutos.

Soya Trypticaseína.

Soya tripticaseína es usado para aislar y cultivar microorganismos exigentes y no fermentadores; así, como bacterias anaerobias y aerobias, aunque este medio no es selectivo para anaerobios.

Preparación:

Digerido pancreática de caseína	15.0g
Digerido papaínico de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
PH final	7.3 ± 0.2

Disolver 40.0g del polvo en 1 litro de agua purificada , mezclar rigurosamente.

Mezclar con agitación constante y ebulir por 1 minuto para completar la disolución del agar.

Esterilizar en autoclave a 121°C/15minutos.

ANEXO VIII.

SISTEMAS BBL CRYSTAL de Identificación (Id)

El sistema BBL CRYSTAL para la identificación de **bacterias Gram positivas (GP)** es un método de identificación en miniatura que utiliza sustratos convencionales, **flurogénicos** y **chromogénicos** modificados. Se ha diseñado para la identificación de bacterias aerobias gram-positivas aisladas frecuentemente de muestras clínicas.

PRINCIPIO.

Los paneles del sistema BBL CRYSTAL GP contiene 29 sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los sustratos se utiliza una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo.

Las pruebas usadas en el sistema se basan en la utilización y degradación microbiana de sustratos **flurogénicos** que contienen derivados cumarínicos del 4-metil-umbeliferona (4MU) o del 7-amino-4-metilcumarín (7-AMC) resulta en un aumento de la fluorescencia que se detecta fácilmente a simple vista con una lámpara de luz ultravioleta. Los sustratos **chromogénicos**; después de sufrir hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente. Además, hay pruebas que detectan la capacidad de un organismo de hidrolizar, degradar, reducir o de alguna forma utilizar un sustrato del sistema BBL CRYSTAL.

El sistema BBL CRYSTAL E/NF para la identificación de **patógenos entéricos / no fermentadores** es un método de identificación en miniatura que utiliza sustratos **chromogénicos** y convencionales modificados. Se ha diseñado para la identificación de bacterias aerobias gram-negativas, de origen humano fermentantes y no fermentantes de glucosa más frecuentemente aisladas.

PRINCIPIO.

Los paneles del sistema BBL CRYSTAL E/NF contiene 30 sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los sustratos se utiliza una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo. Las pruebas usadas en el sistema se basan en la utilización y degradación microbiana de sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores.

Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un microorganismo de metabolizar carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación se basan en la capacidad de un microorganismo de metabolizar el sustrato usando el oxígeno como aceptor final de electrones. Ambas reacciones se detectan en general con un indicador de pH en el sustrato de la prueba. Los sustratos **cromogénicos**; producen, como resultado de una hidrólisis, cambios de color que pueden detectarse visualmente. Además, hay pruebas que detectan la capacidad de un organismo de hidrolizar, degradar, reducir o de alguna manera utilizar un sustrato del sistema BBL CRYSTAL.

PROCEDIMIENTO GENERAL.

1. Sacar las tapas de la envoltura y desechar el desecante.
2. Tomar un tubo de fluido de inóculo y anotar el número de la muestra en la etiqueta. Usar una técnica aséptica, levantar con la punta de una asa bacteriológica estéril varias colonias de la misma morfología.
3. Poner las colonias en suspensión en tubo BBL CRYSTAL del fluido de inóculo.
4. Volver a tapar el tubo y agitar. La turbidez deberá ser equivalente a un patrón Mc Farland N° 0.5.
4. Tomar una base y anotar el número de muestra en el costado.
5. Verter todo el contenido del tubo de fluido de inóculo en el área demarcada de la base.
6. Tomar la base con ambas manos, balanceándola suavemente hasta que los pocillos se llenen con el inóculo. Balancear la base nuevamente para escurrir el exceso del líquido de vuelta al área de marcada, y poner la base sobre la mesa.
7. Alinear la tapa de modo que el extremo donde se encuentra la inscripción esté sobre el área demarcada de la base.

8. Presionar hacia abajo hasta sentir una leve resistencia. Poner los pulgares a cada lado del borde de la tapa en el medio del panel y presionar hacia abajo simultáneamente hasta que la tapa se asiente en su lugar.

Prueba de cultivo puro: Para determinar la pureza del cultivo, extraer una pequeña gota del tubo de fluido de inóculo con una asa bacteriológica estéril, antes o después de inocular la base, e inocular un tubo de agar inclinado o una placa. Deseche el tubo del fluido de inóculo con su tapón en el recipiente para desechos biopeligrosos. Incube el tubo de agar inclinado o placa durante 24 – 48h a una temperatura de 35 – 37° bajo condiciones adecuadas.

Incubación: Poner los paneles inocularados boca abajo (etiqueta hacia abajo) en una incubadora sin CO₂ con 40 a 60% de humedad relativa. El tiempo de incubación es de 18 – 24 h a una temperatura de 35 – 37°C.

NOTA.

Para gram positivos requiere una tinción de gram.

Para gram negativos requiere de pruebas de oxidasa e indol.

K. ANEXO IX.

TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram fue desarrollada empíricamente por Christian Gram en 1884. Esta tinción es uno de los primeros pasos que se realizan para cualquier identificación bacteriana.

Esta técnica es capaz de diferenciar dos grandes grupos de eubacterias: Gram positivas y Gram negativas.

FUNDAMENTO.

En la tinción de gram se requieren 4 soluciones:

Cristal violeta (primer colorante). Es un colorante básico que en contacto con las células reacciona con ellas coloreándolas.

Solución yodo – yodurada (mordiente). Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes suelen ser sales metálicas, ácidos o bases.

Mezcla alcohol – acetona (1:1). Es un agente decolorante que actúa como solvente orgánico.

Safranina (colorante de contraste). Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante.

Los dos grupos bacterianos difieren por el color con el que finalmente aparecen; las bacterias Gram positivas se tiñen de azul-violeta por el cristal violeta, mientras las Gram negativas perderán la coloración del cristal violeta adquiriendo uno rosado por la safranina. Lo anterior es debido a la composición de su envoltura celular; pues las Gram + poseen una malla de péptidoglicano en su parte más externa, mientras que las Gram – los recubre una fina capa de péptidoglicano, presentan una membrana externa que envuelve toda la célula.

Para evitar algún falso, es recomendable trabajar con cultivos en fase exponencial, ya que las bacterias gram + en fase estacionaria pueden aparecer como gram -.

cedimiento:

1. Preparar frotis bacteriano.
2. Teñir con cristal violeta por 1 minuto.
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
4. Cubrir con lugol por 1 minuto.
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Decolorar con alcohol-acetona hasta que la preparación deje de perder color (30 segundos).
7. Lavar con abundante agua para eliminar el exceso de disolvente.
8. Teñir con safranina durante 1 minuto.
9. Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.
10. Secar la preparación.
11. Examinar la preparación al microscopio.



1 CRISTAL VIOLETA (1 min)



5 ALCOHOL-ACETONA



2 LAVAR



6 LAVAR



3 LUGOL (1 min)



7 SAFRANINA (1 min)



4 LAVAR



8 LAVAR



9 SECAR

Técnica de Gram

I. BIBLIOGRAFÍA

- AoAc, Official Methods of Analysis; 14a. ed., USA (1984).
- BAKER F. J.; Manual de técnicas de bacteriología; editorial Acribia; España (1970).
- BALOWS A.J. HAUSLER W., ETAL.; Manual of Clinical Microbiology; 5ªed.; American Society for Microbiology; Washington, D.C. (1991).
- BODEN K. MARIA AND FLOCK JAN INGMAR; Evidence for three different antigen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain ATCC 12228; Microbial Pathogenesis (Molecular and Cellular Biology of Infectious Diseases); 12, 4 (1992), 289-298.
- BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P.; Microbiología Alimentaria; Edit. Acribia, España (1995).
- COREY M, FAREWELL V.; Determinants of mortality from cystic fibrosis in children; Am J Epidemiol; 1996;143:1007-17.
- CLARENCE A. DISCHER; Química Inorganica Farmacéutica; Edit. Alhambra, España, Madrid (1968).
- DIXON R, KSALOW D, MACKEL C, FULKERSON C, MOLLISON G.; Quaternary ammonium antiseptics and disinfectants—use and misuse; JAMA; 1977;236:2415-7.
- FLORES LUNA JOSÉ LUIS, ETAL; Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad; Secretaria de Salud; México (1996).
- FREEMAN BOB A.; Microbiología de Burrows; 22ed.; editorial Interamericana; McGraw Hill; México (1989).
- G. I. BARROW AND RICA FELTHAM. COWAN AND STEEL'S; Manual for Identification of Medical Bacteria; 3ª ed.; Edit. University Press Cambridge; Great Britain (1993).
- GOLDMANN D, KLINGER J.; Pseudomonas cepacia: Biology, mechanisms of infection, epidemiology; J Pediatr.; 1986;108:806-12

GOVAN J, BROWN P, MADDISON J, DOHERTY C, NELSON J, DODD M, AL.; Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic osis; Lancet; 1993;342:15-9.

GOVAN J, HUGHES J, VANDAMME P.; *Burkholderia cepacia*: medical, nomic and ecological issues; J Med Microbiol; 1996;45:395-407.

Guía para la inspección de la validación de los procesos de limpieza. FDA. erial recopilado por AFM.

Guía de CIPAM; Cuartos limpios; México D.F. 18 de agosto de (1988).

HOMMA Y, SATO Z, HIRAYAMA F, KANNO K, SHIRAHAMA H, SUZUI Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control oilborne pathogens; Soil Biology and Biochemistry; 1989;21:723-8.

HYDE J, HUMPHREYS H.; Absence of *Burkholderia cepacia* from the iratory tract of non-cystic fibrosis patients; Eur J Clin Microbiol Infect Dis ; 7;16:253-4.

JAQUELYN G. BLACK; Microbiology Principles & Application; 3a. ed.; orial Prentice - Hall, Inc.; E.U.A. (1993).

JARVIS W, OLSON D, TABLAN O, MARTONE J.; The epidemiology of comial *Pseudomonas cepacia* infections: endemic infections; Eur J Epidemiol ; 7;3:233-6.

JOSEPH R., RUBINO AND JANICE M. BAUER.; Hard surface carrier test for acy testing of disinfectants: collaborative study; Journal of AOAC international; 2; 75:4:635-645.

KING E, PARKE J.; Population density of the biocontrol agent *Burkholderia cia* AMMDR1 on four pea cultivars; Soil Biology and Biochemistry; 1996; 06-12.

LEBLANC D. A., ETAL.; "Cleaning Tecnology for Pharmaceutical ufacturing"; Pharm.Tech. ; July (1993).

LEWINSON W., JAWETZ E.; Microbiología e Inmunología Médicas evaluación aso; editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V., México (1992).

LIPUMA J, MORTENSEN J, DASEN, S, STULL T.; Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers; J Pediatrics; 1988;113:859-62.

PALLERONI AND HOLMES; Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of ten species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the new species *Burkholderia cepacia* comb. nov.; Microbiol. Immunol.; 1992, 36, 1251-1275.

PITT T, KAUFMANN M, PATEL P, BENGE L, GASKIN S, LIVERMORE D.; Genetic characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia (pseudomonas) cepacia* isolated from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and Republic of Ireland; J Med Microbiol; 1996;44:203-10.

PRADEAN DOMINIQUE; Análisis Químico farmacéuticos de Medicamentos; Editorial UTEHA Noriega editores; México (1998).

Procedimientos Normalizados de Operación (PEO's):

P2 - 139 Procedimiento para la elaboración de PEO's de limpieza de áreas y equipos.

P2 - 225 Procedimiento para la preparación de soluciones desinfectantes del área de líquidos.

MB - 25 Evaluación de la limpieza de equipos de producción (análisis microbiológico y TOC).

MB2 -06 Método General de Prueba para la determinación de la Actividad de Agentes Sanitizantes.

Proyecto de NOM-060-SSA-1993, Regulación sanitaria para establecimiento de la industria químico-farmacéutica.

R. MORRIS; Reduction of microbial levels in sewage effluents using chlorine and peracetic acid disinfectants; Wat. Sci. Tech.; 27:3-4:387-393; (1993).

SAJJAN U, SUN L, GOLDSTEIN R, FORSTNER J.; Cable (Cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: nucleotide sequence of the *cbIA* major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage; J Bacteriol; 1995;177:1030-8.

SUN L, JIANG R-Z, STEINBACH S, HOLMES A, CAMPANELLI C, RSTNER J, ET AL.; The emergence of a highly transmissible lineage of *cblI*⁺ *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* causing CF centre epidemics in North America Britain; Nat Med; 1995;1:661-6.

TABLAN O, CHORBA T, SCHIDLOW D, WHITE J, HARDY K, GILLIGAN P, AL.; *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors clinical outcome; J Pediatr; 1984;107:382-7.

TABLAN O, MARTONE W, COERSHUK D, STERN R, THOMASSEN MJ, NGER J, ET AL.; Colonization of the respiratory tract with *Pseudomonas cepacia* cystic fibrosis; Chest; 1987;91:527-32.

THOMASSEN MJ, DEMKO C, DOERSHUK C, STERN R, KLINGER J.; *Pseudomonas cepacia*: decrease in colonization in patients with cystic fibrosis; Am Rev Respir Dis; 1986;134:669-71.

THOMASSEN MJ, DEMKO C, KLINGER, J, STERN, R.; *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis—a new opportunist; Am Rev Respir Dis; 1985;131:791-6.

TORTORA J. GERARD, ETAL; Microbiology *An Introduction*. 5a. ed.; Editorial jamin/Cummings Publishind; Cánada (1995).

VANDAMME P, HOLMES B, VANCANNEYT M, COENYE T, HOSTE B, OPMAN R, ET AL.; Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans sp nov.*; Int J Syst Microbiol; 1997;47:1188-200.