



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

“LIMITES MICROBIANOS DE PRODUCTOS NO ESTERILES”.

MEMORIA DE DESEMPEÑO PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :

ARACELI TORRES JAIME

ASESORA: M. en F.C. MARIA EUGENIA R. POSADA GALARZA



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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

La Memoria de Desempeño Profesional: Límites Microbianos de Productos
no Estériles.

que presenta la pasante: Araceli Torres Jaime
con número de cuenta: 8653162-7 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Abril del 2002

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL M. en F.C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

SECRETARIO M. en C. Eva Ma. Molina Trinidad

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Hector Coss Garduño

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Ana Laura Vazquez Martínez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios su bondad para con migo.

Les doy las gracias infinitamente a mis queridos Padres.

Agradezco el apoyo y comprensión de mi amado esposo Daniel y mi querido hijo Erick.

Gracias estimados Maestros y Amigos.

DEDICATORIA

A mi hijo Erick, y a mi esposo Daniel para que siempre tengan presente que no deben darse por vencidos sin haber agotado todos sus recursos.

El Consejo familiar

Hija, ponte a estudiar que la tierra a conciencia hay que labrar, no por ser campesino tonto hay que ser, hay que labrar la tierra y saber leer.

Legado de mis Padres.

INDICE

Índice	Pag. 1
Indice de tablas	Pag. 2
Resumen	Pag. 3
Introducción	Pag. 4
Objetivo	Pag. 6
Generalidades	Pag. 7
Resultados	Pag. 14
Esterilización por calor húmedo.....	Pag.15
Promoción de crecimiento	Pag.20
Resiembra de cepas	Pag.26
Análisis microbiológico del agua.....	Pag.34
Análisis de límites microbianos.....	Pag. 43
Diagrama de flujo.....	Pag.58
Reto de sanitizantes.....	Pag.59
Análisis de monitoreo ambiental microbiológico para áreas clase 100 000..	Pag. 67
Gráficas de resultados.....	Pag. 75
Discusión de resultados.....	Pag. 85
Conclusiones.....	Pag 91
Glosario de Símbolos y Abreviaturas.....	Pag. 92
Bibliografía.....	Pag. 93

INDICE DE TABLAS

TABLA I (Factores que afectan la calidad de los medios de cultivo).....	Pag. 8
TABLA II (Errores mas comunes en la preparación de medios de cultivo).	Pag. 22
TABLA III (Morfología colonial y microscópica de las cepas de referencia).	Pag. 28
TABLA IV (Morfología colonial y microscópica del <i>S. aureus</i>).....	Pag. 36
TABLA V (Morfología colonial y microscópica de <i>Ps. aeruginosa</i>).....	Pag. 36
TABLA VI (Morfología colonial y microscópica de <i>E. coli</i>	Pag. 37
TABLA VII (Morfología colonial y microscópica de <i>S. typhi</i>).....	Pag. 38
TABLA VIII (Tipos de agua para uso farmacéutico).....	Pag. 39
TABLA IX (Características de <i>S. aureus</i>).....	Pag. 48
TABLA X (Características de <i>Ps. aeruginosa</i>).....	Pag. 49
TABLA XI (características de <i>Samonella sp.</i>).....	Pag. 52
TABLA XII (Características de <i>E. coli</i>).....	Pag. 53
TABLA XIII (Criterios del monitoreo de partículas viables).....	Pag. 70

RESUMEN

El objetivo del personal profesional y de apoyo de un departamento de Microbiología, es garantizar la calidad de los productos farmacéuticos, como consecuencia se han incrementado los parámetros que es menester tener bajo control, por lo que en este trabajo se hace especial incapié en la importancia que tiene el control, Microbiológico dentro de la industria farmacéutica.

El control de los componentes de la infraestructura de un laboratorio de microbiología, es indispensable para que los resultados obtenidos solo dependan de la habilidad y experiencia de los microbiólogos, así como del empleo de una buena metodología en esta forma las aberraciones, contaminaciones ó inseguridades no serán atribuibles a posibles o supuestas fallas en el departamento de control microbiológico.

En el presente trabajo se destacan los puntos que se consideran importantes en la práctica del Control Microbiológico en la industria farmacéutica, para asegurar la calidad microbiológica de los productos farmacéuticos no estériles, y que constantemente se pasan por alto, ya sea por desconocimiento, o porque se consideran obvios o por descuido, tal es el caso del monitoreo ambiental de las áreas de producción, de la Promoción de crecimiento de los medios de cultivo, del análisis microbiológico del agua que se utiliza en la fabricación de los productos, del ciclo de esterilización por calor húmedo, y del reto de sanitizantes y sobre todo del procedimiento de límites microbianos de productos no estériles para las formas farmacéuticas sólidas, como es el caso de las tabletas, cápsulas, suspensiones para preparar, capletas etc. ya que en la actualidad no existe ninguna normatividad que pida el análisis microbiológico de estas formas farmacéuticas y que debido al objetivo que tiene esta prueba de garantizar la calidad sanitaria de los productos farmacéuticos no estériles, mediante la investigación de microorganismos mesofílicos aerobios, hongos filamentosos y levaduras, así como la averiguación de microorganismos objetables en dichos productos es necesario se tome en cuenta para de esta manera obtener como resultado productos seguros y confiables.

INTRODUCCION

Desde la más remota antigüedad, ha sido constante la preocupación por preservar y restablecer la salud cuando esta se encuentre alterada. Por necesidad lógica, los primeros medios utilizados por el hombre para este propósito, fueron los naturales, observando y aprovechando los efectos que causaban en él o en los animales con los que convivía obligadamente.

El uso de raíces, tallos hojas y semillas desde tiempos ancestrales ha sido un importante recurso para las curaciones, en forma de una infusión o de una aplicación directa, molida o natural.

La continua investigación ha permitido ser la base para el descubrimiento y desarrollo de nuevas aplicaciones curativas y derivados de las mismas plantas, de esta manera se empezaron a crear diferentes formas farmacéuticas y con ello se conocieron diferentes sustancias, que podían ayudar a la mejor administración del medicamento, creando así los excipientes, que son todas aquellas materias primas que intervienen en la fabricación de un producto y que son usadas como vehículo del principio activo, para una mejor incorporación y manejo del mismo.⁽⁶⁾

El Principio activo es toda sustancia natural o sintética que tenga alguna actividad farmacológica que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas definidas. Debe reunir condiciones para ser empleada como medicamento o como ingrediente en la manufactura de otro medicamento compuesto.⁽⁷⁾

Las primeras demostraciones de la actividad farmacéutica fueron la selección de los ingredientes, la búsqueda de los métodos de conservación y estabilización. La química, la toxicología y la farmacología tuvieron en su origen estas preocupaciones.⁽¹⁾

El gran adelanto de estas ciencias ha permitido a la medicina contar con productos cada vez más específicos, menos tóxicos y terapéuticamente más eficaces.

Dentro del Control de Calidad de los medicamentos, el control químico, así como también el control microbiológico y el control de calidad físico han adquirido en los últimos años una importancia cada vez mayor. Como consecuencia, se han multiplicado los parámetros que es menester tener bajo control para asegurar la confiabilidad de los resultados analíticos obtenidos.

INTRODUCCION

El objetivo del personal profesional y de apoyo de un departamento de Control de Calidad es garantizar esa seguridad con todas las medidas de control apropiadas que forman parte integral de un procedimiento de operación estandarizado.

En los análisis de calidad de un medicamento intervienen varios factores que lo hacen semejante a cualquier proceso industrial y que se enumeran a continuación:

- 1) Personal
- 2) Materias primas.
- 3) Materiales, equipos e instrumentos.
- 4) Instalaciones.
- 5) Metodología.
- 6) Controles.

El Control de los componentes de la infraestructura de un laboratorio de Control de Calidad, es indispensable para que los resultados obtenidos solo dependan de la capacidad y experiencia de los profesionales en el área, así como el empleo de una buena metodología.

De esta manera las posibles aberraciones, contaminaciones o inseguridades no serán atribuibles a supuestas fallas en la infraestructura.

De esta manera para garantizar que un producto farmacéutico no estéril cumplirá con su función terapéutica y será confiable y seguro, se deberá someter a diversas pruebas de Control de Calidad desde el momento en que es surtido por el almacén hasta que es un producto terminado, así se tendrán tres tipos de análisis:

- Análisis de materias primas.
- Análisis de productos intermedios.
- Análisis de productos terminados.⁽⁹⁾

OBJETIVO:

IMPLEMENTAR TÉCNICAS Y CRITERIOS QUE SEAN ÚTILES EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGIA, PARA GARANTIZAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES.

GENERALIDADES

En el análisis microbiológico de un medicamento intervienen varios factores que lo hacen semejante a cualquier proceso industrial y que se numeran a continuación:

- 1.- Personal
- 2.- Materias primas.
- 3.- Materiales, equipos e instrumentos.
- 4.- Instalaciones.
- 5.- Metodología.
- 6.- Controles.

Cada uno de estos factores se puede considerar constituido por dos tipos de componentes:

- a) Los que son comunes a todos los análisis microbiológicos.
- b) Los especiales para un determinado tipo de análisis microbiológico.

Entre los componentes pertenecientes al primer tipo tenemos:

- a) Personal
- b) Materias primas generales (agua, agar, glucosa etc.)
- c) Materiales y equipo de uso general (Vidriería, hornos, autoclaves incubadoras etc.)
- d) Metodología general (Preparación de medios, manejo del cepario etc.)
- e) Controles (Los correspondientes a los puntos c y d arriba mencionados)

Los métodos analíticos que se llevan a cabo en un gran número de laboratorios de control microbiológico, se pueden dividir en dos grandes grupos:

- 1) Métodos analíticos microbiológicos como: Límites microbianos, análisis de agua etc. Que son comunes en la mayoría de los laboratorios farmacéuticos.
- 2) Métodos de valoraciones de potencia de antibióticos, determinaciones de contenido vitamínico, esterilidades, contaminantes microbiológicos etc. Que son específicos en los laboratorios farmacéuticos.⁽¹⁾

GENERALIDADES

Dado que el agua es la materia prima universal ya que se ocupa en todos los análisis microbiológicos es necesario conocer los tipos de agua que existen así como también el papel tan importante que juega en este tipo de análisis.

AGUA:

El agua es una materia prima que interviene en todos los procesos de fabricación, en limpieza de material, en la limpieza del equipo e instrumentos etcétera, en los análisis microbiológicos y químicos, por lo tanto es muy importante.⁽⁴⁾

El agua puede dividirse en potable y purificada

Agua purificada:

Es un agua con un alto grado de pureza química, pero esto no la convierte simultáneamente en agua microbiológicamente pura.

Varios microorganismos, encuentran en el agua purificada un ambiente que les ofrece condiciones ideales para sobrevivir y multiplicarse. Aun en el agua destilada que es extremadamente pobre en nutrientes, pueden desarrollarse microorganismos como las *Pseudomonas*.⁽⁴⁾

Agua potable:

Agua que ha sido tratada antes de su uso con agentes desinfectantes como es el caso del hipoclorito de sodio, que se utiliza para clorar el agua y así bajar la carga bacteriana que pudiera estar contenida en ella.

Agua para análisis microbiológicos:

Para análisis microbiológicos se recomienda el uso de agua purificada y controlada microbiológicamente en forma periódica y permanente.

GENERALIDADES

El agua desmineralizada puede usarse cuando no interfiera con el tipo de análisis que se hace, pero no debe emplearse para el lavado y enjuague de material destinado para el análisis de vitaminas, como la cianocobalamina, ya que en los tejidos de intercambio iónico pueden permanecer microorganismos capaces de producir vitamina B12.

Se debe demostrar que en el agua que se utilice para los análisis microbiológicos no contengan sustancias inhibitoras o promotoras del crecimiento a fin de determinar su uso o rechazo.

La mejor información acerca de la calidad microbiológica del agua para preparación de medios de cultivo, soluciones, lavado, autoclaves etc. se obtiene cuando se emplea el método de filtración, porque la muestra es más representativa.

Los resultados de los análisis microbiológicos del agua son registrados, así como las medidas que se apliquen cuando los datos obtenidos del agua estén fuera de especificación. ⁽¹⁰⁾

Los Medios de cultivo se fabrican con agua desmineralizada, deionizada o destilada ya que requieren de un agua purificada que no contenga inhibidores bacterianos, que no influya en el pH del medio de cultivo para que este no se vea afectado en sus propiedades y puedan crecer los microorganismos para los cuales fueron designados estos medios de cultivo, por lo que se tomará en cuenta lo que se presenta a continuación:

1.- MEDIOS DE CULTIVO

Las técnicas microbiológicas requieren medios de cultivo que contengan los nutrientes y las condiciones fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de uno o mas grupos de microorganismos.

La validez de los resultados obtenidos, depende en forma importante del medio de cultivo empleado y de su calidad, la cual debe verificarse y controlarse a cada paso de su preparación. ⁽⁶⁾

GENERALIDADES

2.- LA CALIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO:

Una vez preparado el medio de cultivo se debe verificar:

- a) pH
- b) Esterilidad.
- c) Promoción de crecimiento.

Con todos estos parámetros controlados de los medios de cultivo se pueden realizar estudios comparativos cualitativos y cuantitativos de formulaciones similares de diferentes lotes y marcas de medios de cultivo, para obtener la sensibilidad de cada uno hacia el microorganismo seleccionado y así se determinan marcas de proveedores con los que se obtienen mejores resultados.⁽⁶⁾

A continuación se presentan los factores que mas comúnmente causan problemas en la calidad de los medios de cultivo.

TABLA 1
LOS FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DURANTE SU PREPARACIÓN SON LOS SIGUIENTES:

FACTOR	CAUSA PROBABLE
Pesada incorrecta del producto	Error humano
Empleo de productos alterados	Calor, humedad, oxidación u otros factores ambientales.

GENERALIDADES

Agua inadecuada	Presencia de sustancias inhibidoras, o promotoras del crecimiento, por alteraciones de columnas desionizantes.
Empleo de material sucio (aparentemente limpio)	Residuos de detergentes, sustancias Químicas, limpieza defectuosa.
Placas o tubos con agar suave o duro	Falta de uniformidad en la mezcla del producto. Medición incorrecta del agua, agar fuera de especificaciones o alterado.
Alteraciones del medio por hidrólisis de agar, caramelización de carbohidratos, baja del pH, incremento de acción inhibidora, pérdida del colorante en medios selectivos o diferenciales, formación de precipitados.	Sobrecalentamiento durante la preparación del medio de cultivo y/o esterilización del mismo. Esperar demasiado tiempo antes de distribuirlo en las placas de Petri o tubos de ensayo, o frascos.
Esterilización defectuosa del medio de cultivo.	Falta de comprobación con indicadores biológicos, inspección física defectuosa de cada lote, falta de control en los equipos de registro de presión, de temperatura y de tiempo.

GENERALIDADES

FACTOR	CAUSA PROBABLE
pH incorrecto.	pH no ajustado a temperatura ambiente
Placas enriquecidas contaminadas	Empleo de suplementos ó enriquecedores no satisfactorios.
Desarrollo microbiano dudoso ó no característico.	No haber sometido los medios de cultivo a pruebas de promoción de crecimiento.
Alteraciones físicas de los medios de cultivo ya preparados.	Manejo y almacenamiento inadecuados: Falta de vigilancia de la temperatura, luz, humedad, de los medios originales, empaque defectuoso.
Calidad inadecuada de los medios ya preparados.	Procedimientos y programas de control de medios no verificados y actualizados o que no se cumplen.
Ambiente no controlado	Fallas de mantenimiento de los sistemas de inyección de aire, filtros inadecuados.
Falta de reproducibilidad en la calidad de los medios preparados con materiales de diferentes lotes y/o marcas.	Falta de registro y estudios comparativos de resultados obtenidos con diferentes lotes y/o marcas del mismo medio.

GENERALIDADES

Como ya se ha explicado con anterioridad es de vital importancia hacer el control de calidad de los medios de cultivos que serán utilizados en el laboratorio de microbiología, para así estar seguros que los resultados obtenidos en las pruebas microbiológicas de los productos no estériles son correctas.

En el presente estudio se tratará de enfatizar los puntos que la práctica del Control Microbiológico de productos Farmacéuticos no estériles ha enseñado como importantes y que frecuentemente, se pasan por alto, ya sea porque se consideran obvios o bien por descuido o desconocimiento, y que son importantes para evitar aberraciones, contaminaciones o inseguridades.

RESULTADOS

PROCEDIMIENTO:**ESTERILIZACION POR CALOR HUMEDO****OBJETIVO:**

Garantizar la efectividad de esterilización por calor húmedo.

ALCANCE:

Este procedimiento es aplicable a medios de cultivo y a todo aquel material que resista este tipo de proceso.

RESPONSABILIDADES:

Es responsabilidad de los analistas de microbiología llevar a cabo este procedimiento y de su supervisor verificar su realización.

MATERIAL:

- 1.- Caldo Soya Trypticaselna.
- 2.- Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.
- 3.- Tubos de ensayo con tapón de rosca.
- 4.- Indicadores biológicos de esporas de *Bacillus stearothermophilus* ATCC7953, o *Clostridium sporogenes* ATCC3679, *Bacillus subtilis* ATCC5230, en una concentración de 10^3 a 10^6 esporas por unidad.
- 5.- Los indicadores deberán estar validados.
- 6.- Pinzas.
- 7.- Autoclave validada y/u olla de presión calibrada provista de manómetro calibrado.
- 8.- Incubadora (calificada) y con registro de temperatura diario.

PROCEDIMIENTO:

ESTERILIZACION POR CALOR HUMEDO

PROCEDIMIENTO:

- a) Cargar el autoclave u olla de presión según la configuración establecida y colocar los indicadores biológicos en las posiciones asignadas
- b) Correr el ciclo de esterilización tomando las lecturas de precisión y temperatura durante el proceso. **En caso de olla de presión registrar lecturas del manómetro cada 3 minutos.**⁽¹¹⁾
- c) Terminando el ciclo de prueba, incubar los indicadores de la siguiente forma:
 - 1.- Indicador biológico en tiras de papel o liofilizado. Sembrar las muestras asépticamente en tubos que contengan 10 ml. de caldo soya tripticaseína estéril. Incubar los tubos entre 55-60°C y observarlos diariamente hasta completar 7 días de incubación.
 - 2.- Indicador biológico en ampolleta contenido de cultivo e indicador de pH. (generalmente púrpura de bromocresol), incubar las ampolletas a 55-60°C durante un periodo mínimo de 7 días.
- d) Debe incluirse un control positivo e incubarse en las mismas condiciones descritas en el inciso 3 para cada presentación de indicador biológico.
- e) Los medios de cultivo utilizados durante la prueba deben haber cumplido con la prueba de promoción de crecimiento.

PROCEDIMIENTO:

ESTERILIZACION POR CALOR HUMEDO

CRITERIO DE ACEPTACION:

- a). - Para ciclos cuya temperatura nominal sea de 121°C, se permite una caída de temperatura de 1.5 – 2°C, siempre y cuando esta caída no se observe más de 5 minutos.⁽¹¹⁾
- b).- El crecimiento debe ser negativo para los indicadores biológicos de prueba y positivo para el control, con el siguiente criterio para cada presentación.

1.1.- Indicador biológico en tiras de papel y liofilizado.

Las muestras inoculadas en Caldo Soya Trypticaseína no presenta turbiedad en el medio después de la incubación.

El control positivo presenta turbiedad a las 24 y/ o 48 hrs.
Reportar en el formato 1.

2.- Indicador biológico en ampolleta.

No se observa turbiedad en el medio de cultivo y el color de indicador no se modifica después del período de incubación. El control positivo presenta turbiedad del medio de cultivo y vire del indicador debido a la producción de ácido a las 24 o 48 hrs.

NOTA:- Si observa vire del indicador a las 24 - 48 horas sin crecimiento opalescente, reincubar por 48 horas más y asegurarse mediante una siembra en placa, la presencia y/o ausencia de células viables.

PROCEDIMIENTO:

ESTERILIZACION POR CALOR HUMEDO

ANALISIS DE INDICADORES BIOLOGICOS

DEPARTAMENTO: **Control Microbiologico**

FECHA DE PRUEBA: _____

PATRON DE CARGA: _____

CORRIDA No. _____

TIPO DE INDICADOR: _____

No. E LOTE: _____ CADUCIDAD: _____

MICROORGANISMO:

Bacillus subtilis 10⁶

Bacillus stearothermophilus 10⁵

PRUEBA DE ESTERILIDAD

MEDIO DE CULTIVO: **Caldo Soya Tripticaseina**

No. DE LOTE: _____

FECHA DE PREPARACION: _____

No. DE TIRAS USADAS: _____

CONTROL POSITIVO: 1 _____

CONDICIONES DE INCUBACION: **55 +/- 2°C**

TIEMPO 7 días

FECHA DE INICIO: _____

FECHA DE TERMINACION: _____

PROCEDIMIENTO:

ESTERILIZACION POR CALOR HUMEDO

FORMATO 1

DIA	1	2	3	4	5	6	7
BLANCO							
TIRA No. 1							
TIRA No. 2							
TIRA No. 3							
TIRA No. 4							
TIRA No. 5							
TIRA No. 6							
TIRA No. 7							
TIRA No. 8							
TIRA No. 8							
TIRA No. 9							
TIRA No. 10							
TIRA No. 11							
CONTROL POSITIVO							

**RESULTADO (-) CRECIMIENTO NEGATIVO,
(+) CRECIMIENTO POSITIVO**

REALIZO: _____

VERIFICO: _____

Vo. Bo.: _____

PROCEDIMIENTO:**PROMOCION DE CRECIMIENTO****OBJETIVO:**

Demostrar que los diferentes medios de cultivo, cumplen con el fin para el cual fueron diseñados.

ALCANCE:

Este procedimiento aplica a todos los medios de cultivo utilizados en el Laboratorio de Microbiología

MATERIAL Y EQUIPO:

- Medios de cultivo.
- Micropipeta de 20 μ L
- Espátulas.
- Cepas de referencia.
- Espectrofotómetro.
- Balanza granataria.
- Potenciómetro
- Incubadora de 25°C +/- 2°C.
- Incubadora de 35°C +/- 2°C.
- Autoclave u olla de presión con manómetro.
- Termómetro.

PROCEDIMIENTO:
PROMOCION DE CRECIMIENTO

- Puntillas estériles para micropipeta.
- Cajas de Petri.
- Material de vidrio usual para el Laboratorio de Microbiología.

CEPAS DE REFERENCIA.

- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
- <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
- <i>Salmonella typhi</i>	ATCC 13311
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
- <i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
- <i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
- <i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
- <i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
- <i>Lactobacillus leichmannii</i>	ATCC 7830

PROCEDIMIENTO:

PROMOCION DE CRECIMIENTO

PREPARACION Y ESTANDARIZACION DEL INOCULO:

Los cultivos tienen que ser recientes de 18 a 24 horas para bacterias, de 24 a 48 horas para levaduras y de 5 a 7 días para hongos filamentosos.⁽²⁾

Preparar una dilución para cada microorganismo de tal forma que a una longitud de onda de 580 nm nos dé una lectura espectrofotométrica del 50 al 80 % de transmitancia.

De esta suspensión preparar suspensiones diluidas a unidades decimales y realizar una cuenta en placa para cada dilución con el fin de seleccionar aquellas diluciones en las que se encuentren de 10 a 100 UFC/ 20 μ L.⁽⁷⁾

PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS

- 1) Probar un volumen determinado del o de los medios de cultivo preparados y esterilizados.
- 2) A cada uno de los recipientes o tubos que contienen el medio de cultivo, agregar 20 μ L de la suspensión del microorganismo de prueba que contenga entre 10 y 100 UFC.
- 3) Simultáneamente sembrar por duplicado 20 μ L de la suspensión por el método de cuenta en placa con el fin de confirmar la viabilidad y recuperación del inóculo.

PROCEDIMIENTO:

PROMOCION DE CRECIMIENTO

PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS Y SEMISÓLIDOS.

1. Vaciar en cajas Petri los medios de cultivo sólidos, los que sean para pruebas bioquímicas en tubos e inclinar el medio de cultivo y los semisólidos colocarlos en tubos de ensayo.
2. A cada uno de los recipientes o tubos que contienen el medio de cultivo adicionar 20 μ l de suspensión de microorganismo que contenga entre 10 y 100 UFC/mL.
- 3.- Estriar el medio de cultivo con el inóculo en las cajas de Petri y los tubos inclinados.
- 4.- Simultáneamente sembrar por duplicado 20 μ L de la suspensión por el método de cuenta en placa con el fin de confirmar la viabilidad y recuperación del inóculo.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

- 1) Si el tubo o los recipientes que contienen el medio de cultivo inoculado presentan turbiedad y la cuenta en placa es la esperada, la prueba de promoción de crecimiento es correcta y el lote del medio de cultivo se aprueba para su uso.⁽¹⁷⁾

PROCEDIMIENTO:

PROMOCION DE CRECIMIENTO

- 2) Si no presenta desarrollo en los medios de cultivo líquidos y la cuenta en placa es la esperada el lote del medio de cultivo deberá ser rechazado.
- 3) Si no presenta desarrollo en los medios de cultivo, ni en placas, debe verificarse la viabilidad de los inoculos empleados.
- 4) Siempre que el crecimiento sea positivo deberá verificarse que se trate del microorganismo de prueba y no de un contaminante.

Nota: Seguir los criterios de aceptación de acuerdo a las siguientes tablas:

PROCEDIMIENTO:**PROMOCION DE CRECIMIENTO****TABLA II****POSIBLES ERRORES EN LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

FACTOR	CAUSA PROBABLE
pH incorrecto	pH no ajustado a la temperatura ambiente
Desarrollos microbianos con crecimientos no característicos	No haber sometido a los medios de cultivo a pruebas de promoción de crecimiento
Alteraciones físicas de los medios de cultivo ya preparados	Procedimientos y programas de control de medios no verificados y actualizados.
Ambiente no controlado	Fallas de mantenimiento de los sistemas de inyección de aire, filtros inadecuados.
Falta de reproducibilidad en la calidad de los medios preparados con materiales de diferentes lotes y/o marcas	Falta de registro y estudios comparativos de resultados obtenidos con diferentes lotes y/o marcas del mismo medio
Mal preparado el medio	No pesar satisfactoriamente el medio

PROCEDIMIENTO:**RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA****OBJETIVO:**

Establecer un procedimiento de siembra de cepas de referencia para su mantenimiento y conservación, así como las pruebas necesarias para su identificación.

ALCANCE:

Este procedimiento se aplicará a las cepas de referencia existentes en el área de microbiología.

RESPONSABILIDAD:

- Es responsabilidad del químico de control microbiólogo llevar a cabo este procedimiento.
- Es responsabilidad del gerente de control de calidad verificar que este procedimiento se cumpla.

EQUIPO Y MATERIALES:

- Asas bacteriológicas.
- Mechero Fisher.
- Tubos de ensayo de 1.5 x 15 cm
- Porta-objetos.
- Cubre-objetos
- Incubadora de 37°C
- Incubadora de 25°C
- Refrigerador.
- Gradillas.

PROCEDIMIENTO:

RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA

REACTIVOS:

- Aceite de inmersión
- Safranina
- Lugol
- Alcohol-acetona
- Cristal violeta.

MEDIOS DE CULTIVO:

- Medio para antibióticos No 1
- Agar soya tripticaseina.
- Agar para antibióticos No 8.
- Agar para antibióticos No 19
- Agar papa dextrosa.

EQUIPO:

- Incubadora.
- Refrigerador .
- Autoclave.

CEPAS DE REFERENCIA:

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| - <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| - <i>Micrococcus luteus</i> | ATCC 9341 |
| - <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC 6633 |

PROCEDIMIENTO:**RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA**

- <i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6539
- <i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25619
- <i>Lactobacillus leichmannii</i>	ATCC 7830
- <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601
- <i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
- <i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6633

DESARROLLO:**1.- RESIEMBRA DE CEPAS:****1.1 Preparación del medio de cultivo:**

Preparar el medio de cultivo siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor; y distribuir en tubos de ensayo de 1.5 x 15 cm, aproximadamente 10 mL de medio de cultivo, tapar con tapón de rosca y esterilizar, dejar solidificar en posición inclinada.

Preparar 4 tubos por cada cepa, 2 mas para testigos negativos, y 4 mas para las pruebas de control de calidad del medio de cultivo.

1.2.- Identificar cada uno de los tubos con los siguientes datos:

- Nombre del microorganismo.
- No de ATCC
- Fecha de resiembra.
- Fecha de próxima resiembra.

PROCEDIMIENTO:

RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA

- 1.2 Realizar la resiembra de cada cepa utilizando las cepas resemebradas con anterioridad (mes anterior), todas las resiembras serán realizadas por estria y en condiciones estériles.
- 1.3 En caso de no contar con resiembras anteriores, la cepa se tomará de la cepa madre adquirida en el Laboratorio Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud ó el Instituto Politécnico Nacional.
- 1.3.1 El mechero utilizado debe proporcionar una amplia zona de protección bacteriológica que garantice la ausencia de microorganismos contaminantes.

Pasos a seguir.

- a).- Calentar el asa al rojo vivo, empezando junto al porta-asas con la parte azul de la flama subir el asa a la parte amarilla de la flama y gradualmente llegar a la punta.
- b).- Para tomar la asada introducir el asa en el tubo de ensayo que contiene el desarrollo microbiano, dejar enfriar en la parte lateral del tubo y retirar una porción lateral pequeña del cultivo ya sea por arrastre (bacterias y levaduras), ó por desprendimiento (hongos filamentosos).
- c).- Transferir inmediatamente la muestra al tubo de resiembra y estriar el asa en el medio de cultivo.
- d).- Cerrar el tubo e incubar durante 48 hrs para bacterias a 35°C + 2°C y 5 días para hongos y levaduras a 25°C +/- 2 °C.
- e).- Transcurrido el tiempo de incubación, observar que las colonias presenten el color característico y su desarrollo sea el esperado, además de que no tengan contaminantes.
- f).- Los testigos negativos no deberán presentar desarrollo microbiano.

PROCEDIMIENTO:**RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA****1.3.2.- NUMERO DE RESIEMBRAS.**

Las resiembras siempre deben hacerse por duplicado (I y II) e incubar cada una de acuerdo a sus requerimientos de temperatura, oxígeno, anaerobiosis, tiempo etc

Una vez desarrolla la serie I se emplea para la resiembra del siguiente mes y la serie II se emplea para el trabajo analítico rutinario

1.3.3 PREVENCIÓN DE MUTACIONES, CAMBIOS Y RESISTENCIAS.

Los cultivos microbianos de las cepas de la serie II, serán las que se utilicen, y si es necesario se activen, para consumir durante el mes, de esta manera se evita estar continuamente resembrando al microorganismo y así disminuye el riesgo de una mutación.

1.3.4 La resiembra mensual se hace a partir de la serie I del mes anterior y por duplicado.

Si en esta resiembra se obtiene un buen desarrollo característico se desechan los tubos sembrados de la serie II del mes anterior y se repiten los pasos anteriores nuevamente.

Con siembras consecutivas se puede estar trabajando con una cepa que contenga hasta 50 ó 60 pases, por lo tanto las posibilidades de mutación aumentan.⁽²⁰⁾

1.4 IDENTIFICACION:**1.4.1 Observación microscópica: Utilizar un tubo por cada cepa y realizar una tinción de Gram y observar al microscopio.**

Registrar las observaciones en el formato anexo.

1.4.2 Observar la morfología colonial que corresponda al microorganismo en cuestión y registrar en el formato anexo.**1.4.2 Realizar la determinación de género y especie al menos cada seis meses utilizando el estuche de identificación API.**

Anexar tabla de identificación al expediente de cada cepa.

PROCEDIMIENTO:

RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA

1.5. ALMACENAMIENTO:

- 1.5.1 Una vez identificadas y tipificadas las cepas se almacenan en refrigeración a una temperatura de 0 a 4°C, hasta su empleo y próxima resiembra

1.6.- FRECUENCIA:

Las resiembras de las cepas deberán realizarse una vez al mes , y su identificación deberá realizarse al menos cada 6 meses con el estuche de API de Biomeriux.; la morfología colonial y la morfología microscópica deberá realizarse cada que se resiembren las cepas.

1.7. REGISTRO:

Los resultados se registrarán en la bitácora de resiembras.

NOTA: En caso de que una cepa se contamine, de preferencia debe adquirirse otra nueva.; puede reaislarse, pero se debe disponer de todos los medios, reactivos y colorantes que aseguren que la cepa aislada es pura, y conserva las características bioquímicas y de respuesta típicas de la cepa.

A continuación se presentan algunas tablas de las características de las cepas utilizadas en el laboratorio.

PROCEDIMIENTO:

RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA

TABLA III
MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA DE LAS CEPAS⁽¹⁷⁾

Microorganismo	Morfología microscópica	Morfología colonial
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram (+) agrupados en racimos	Vogel Johnson: Colonias negras, redondas, cremosas, convexas manitol (+) que se denota por una coloración amarilla del medio. Sal y manitol: Colonias color crema, redondas, cremosas, convexas, manitol (+) se denota por una coloración amarilla del medio.
<i>Micrococcus luteus</i>	Cocos Gram (+) agrupados en tetradas.	Medio No. 1: Colonias amarillas, cremosas y redondas, con bordes enteros, convexas y brillantes. Medio No. 11: Colonias amarillas, cremosas y redondas, con bordes enteros, convexas y brillantes.
<i>Salmonella typhi</i>	Bacilos cortos Gram (-).	Agar XLD: Colonias rojas, transparentes y bordes amarillos con centro negro. Agar SS: Colonias claras incoloras, transparentes con centro negro.
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos cortos Gram (-).	Agar EMB: Colonias ligeramente convexas, con centro azul-negro y un brillo metálico azul verdoso. Agar McConkey: Colonias de rojas a rosadas rodeadas de un precipitado opaco de sales biliares.

PROCEDIMIENTO:**RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA**

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cocobacilos Gram (-)	Agar Cetrimida: Colonias claras transparentes con fluorescencia verde-azulada a la luz UV. Agar Flo: Colonias claras transparentes con fluorescencia verdosa a la luz UV. Agar Tech: Colonias claras transparentes con pigmento de color verde difundido en el agar del medio a partir de la colonia, a la luz UV la pocianina da un color azul-verdoso.
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilos grandes largos Gram (+).	TSA: Colonias asimétricas grandes, rugosas, con apariencia butirosa.
<i>L. leichmannii</i>	Bacilos largos Gram (+)	Agar de microinoculación: inoculado por picadura se observan colonias ligeramente rugosas color beige.
<i>Aspergillus niger</i>	Micelial	Agar dextrosa papa: Micelio vegetativo color blanco, micelo aereo color negro
<i>Candida albicans</i>	Levaduras	Agar dextrosa papa: Colonias redondas cremosas, color hueso, brillantes y convexas. TSA: Colonias redondas cremosas, color hueso, brillantes y convexas.
<i>Sacharomices cerevisiae</i>	Levaduras	Medio No 19: Colonias redondas, color crema, brillantes y convexas.

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA****OBJETIVO:**

Establecer la metodología a seguir para el análisis microbiológico de Agua Potable y Purificada.

RESPONSABLES:

- Es responsabilidad del analista de Control Microbiológico llevar a cabo este procedimiento.
- Es responsabilidad del supervisor de Control Microbiológico verificar que este procedimiento se cumpla.

MATERIAL Y EQUIPO:

- 1.- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- 2.- Equipo de filtración.
- 3.- Incubadora a 35°C +/- 2°C.
- 4.- Bomba de vacío.
- 5.- Pinzas de disección punta plana de acero inoxidable, estériles.
- 6.- Membranas estériles de 47 mm de diámetro y poro de 0.22 µ.
- 7.- Pipetas graduadas de 1 mL. estériles
- 8.- Gradilla para tubos.
- 9.- Tubos de vidrio de 1.5cm X 15 cm. De rosca con tapón de baquelita.
- 10.- Matraz Kitazato de 1l.
- 11.- Gasa estéril.
- 12.- Cajas de Petri

PROCEDIMIENTO:**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA****REACTIVOS:**

- a) Agar de Soya Tripticaseína (AST).
- b) Caldo Lactosado (CL).
- c) Medios para aislamiento de microorganismos.
- d) Caldo Soya tripticaseína (CS).
- e) Medios para selección de microorganismos.
- f) Medios para pruebas bioquímicas.
- g) Agua peptonada

RECOMENDACIONES GENERALES:

- 1.- Los medios de cultivo utilizados para la prueba serán preparados de acuerdo a las especificaciones del marbete del proveedor del medio de cultivo.⁽¹⁷⁾
- 2.- La toma de muestras se realizará de acuerdo a los procedimientos de muestreo de agua potable y muestreo de agua purificada.⁽²¹⁾

DESARROLLO:**1) Método de Filtración de Membrana.**

Se colectan 100 mL de muestra y se filtran a través de una membrana de 47 mm de diámetro y poro de 0.22 micras, enjuagar con 30 mL de agua peptonada estéril y colocar el filtro en una placa con Agar de Soya Tripticaseína e incubar a 35°C +/- 2°C por 48 hrs para la determinación del número de mesofílicos aerobios por 100 mililitros.⁽¹¹⁾

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA

2) Identificación de patógenos

- a).- Tomar 1.0 ml de la muestra de agua y transferirlos a un tubo que contenga 9.0 ml de medio caldo soya tripticaseína (CS)., mezclar e incubar a 35°C +/- 2°C durante 18 a 24 horas.⁽¹⁹⁾
- b).- Tomar 1.0 ml de muestra de agua y transferirlo a un tubo que contenga 9.0 mililitros de Caldo Lactosado (CL) e incubar a 35°C +/- 2°C, durante 18 a 24 horas.⁽¹⁹⁾

Si el tubo de Caldo Soya presenta desarrollo microbiano proceder a la siguiente identificación.

2.1 Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tomar con una asa una porción del cultivo obtenido en el tubo de caldo soya inoculado con la muestra al término de su incubación, inocular por estría las cajas Petri que contengan los medios de: agar Vogel Johnson, Sal y Manitol, Cetrimida, Tech y Flo, incubar a 35°C +/- 2°C durante 18 a 24 hrs.

Las colonias sospechosas del medio de Agar Cetrimida, agar tech ó agar flo se observan a la luz ultravioleta y se comparan con lo que indica el cuadro No. 2.⁽¹⁵⁾

Si las cajas Petri poseen desarrollo microbiano que coincida con lo que indica el cuadro No. 2 realizar una tinción de Gram. Si se encuentran bacilos Gram (-) y la prueba de Oxidasa es positiva al igual que la de catalasa nos sugiere la presencia de *Pseudomonas sp.* Y se continúa con la identificación para obtener género y especie.

Prueba de Oxidasa.

Impregnar una tira de papel filtro con dicloruro de N-N-dimetil-p-fenilendiamina al 1% p/v y sobre ella colocar una porción de la colonia sospechosa obtenida, si se produce un color rosa que cambia hasta púrpura, la prueba es positiva.⁽¹⁴⁾

PROCEDIMIENTO:

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA

Prueba de Catalasa:

Colocar una colonia sospechosa del microorganismo en cuestión sobre un trozo de papel filtro, adicionar unas gotas de peróxido de hidrógeno y esperar 30 segundos, si en este tiempo presenta un burbujeo la colonia, se dice que es catalasa positiva.

2.2 Identificación de *Staphylococcus aureus*:

A partir de las cajas sembradas para el aislamiento de patógenos, comparar las colonias obtenidas en los medios de cultivo de Vogel Johnson y sal y manitol con el cuadro No. 2. Si las características de las colonias coinciden, realizar una tinción de Gram y si en la morfología microscópica aparecen Cocos Gram (+) agrupados en racimos, proceder a realizar una prueba de Coagulasa que es definitiva, para comprobar que se trate de un *Staphylococcus aureus*, ya que el *St. aureus* es coagulasa positiva y se continúa con el procedimiento para identificación de patógenos.⁽¹⁴⁾

2.3 Identificación de *Escherichia Coli*.

Tomar con una asa una porción del cultivo obtenido en el tubo de caldo lactosado e inocular por estria cruzada en una caja petri que contenga medio de Agar Mc Conkey, y otra caja de Petri que contenga medio EMB incubar a 35°C +/- 2°C por 24 a 48 hrs.

Si la caja Petri no presenta desarrollo o este no coincide con las características descritas en el cuadro 3, la muestra está libre de *Escherichia coli*.

Si las cajas petri poseen desarrollo característico al descrito en el cuadro 3, con una asa transferir las colonias sospechosas a un medio de agar soya tripticaseína y a partir de este, realizar una tinción de Gram, si en la morfología microscópica nos aparecen Bacilos gram (-) llevar a cabo la prueba confirmatoria de *Escherichia coli* haciendo pruebas Bioquímicas.⁽¹⁴⁾

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS MICROBIOLOGICO DEL AGUA

Prueba confirmatoria de *Escherichia coli*.

Con una asa transferir colonias obtenidas del Agar soya tripticaseina a los medios preparados para la identificación y seguir con el procedimiento para identificación de microorganismos(Estuche de identificación API).

Identificación de *Salmonella sp.*

Tomar un 1 mL de cultivo de la muestra obtenida en el tubo de caldo lactosado e inocular 2 tubos que contengan 9.0 mL de medio fluido Selenito Cistina ó 9.0 mL de medio fluido tetrationato respectivamente, incubar de 18-24 hrs. a 35°C +/- 2°C. del cultivo seleccionado inocular por estría cruzada la superficie de cajas petri con Agar-Lisina Desoxicolato y Agar Salmonella-Shigella, incubar 18-24 hrs. a 35°C +/- 2°C. ⁽¹⁹⁾

Si las cajas Petri no presentan desarrollo o no tienen la morfología característica descrita en el cuadro 4, realizar tinción de Gram, y confirmar la presencia de *Salmonella* con pruebas Bioquímicas siguiendo el procedimiento para identificación de patógenos.

RESULTADOS:

- 1.- Para una declaración cuantitativa después del período de incubación, se cuentan las colonias que se han formado, para la evaluación se prefieren placas que muestren de 30 a 300 UFC (Unidades formadoras de colonias). En el caso de haber realizado diluciones de la muestra, el número de UFC/ml se determina multiplicando el número de colonias en la placa por el valor recíproco del correspondiente factor de dilución, que en este caso sería 100, ya que es el volumen que se filtro de muestra.
- 2.- Para el método de Identificación de microorganismos patógenos, la muestra satisface la prueba si ninguno de los microorganismos patógenos investigados está presente.

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA****CUADROS DE CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS****TABLA IV****CUADRO 1 ⁽¹⁾**

<i>Staphylococcus aureus:</i>			
Medio Selectivo	Medio de Agar Vogel – Johnson	Medio de Agar Sal y Manitol	Agar Baird Parker
Características Morfológicas de la Colonia	Colonias negras, rodeadas de una zona amarilla	Colonias amarillas con zonas amarillas por cambio de color del medio.	Colonias negras brillantes rodeadas de zonas claras
Tinción de Gram	cocos Gram (+) agrupados en racimos	cocos Gram (+) agrupados en racimos	cocos Gram (+) agrupados en racimos

TABLA V**CUADRO 2 ⁽¹⁾**

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Medio Selectivo	Medio Agar Tech	Medio de Agar Cetrimida
Características Morfológicas de la Colonial	Colonias verde-azulosa, a la luz Ultravioleta son verdosas azul-verde.	Colonias verde azulosas, a luz UV son verdosas.
Tinción de Gram	Cocobacilos Gram negativos	Cocobacilos Gram negativos
Fluorescencia en Luz Ultravioleta	Colonias azul verdosas	Colonias verdosas

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA****CUADROS DE CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS****TABLA VI****CUADRO 3 ⁽¹⁾**

<i>Escherichia coli:</i>		
Medio Selectivo.	Agar Mc Conkey	EMB
Características Morfológicas de la Colonia	Colonias de color rojo a rosa puede estar rodeada de una zona precipitada de sales biliares.	Colonias pequeñas de color azul-negro en la parte central y bordes claros a la luz transmitida. Presenta brillo metálico verdoso a la luz reflejada.
Tinción de Gram	cocobacilos Gram (-)	cocobacilos Gram (-)

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA****TABLA VII****CUADRO 4 ⁽¹⁾**

Salmonella Sp:	
Medio Selectivo	Descripción de las colonias
Agar SS.	Colonias ambarinas con centro negro y halo claro alrededor.
Agar XLD.	Colonias rojas transparentes y bordes amarillos con centro negro, si producen H ₂ S. Sin centro negro si no son productoras de H ₂ S.

ESPECIFICACIONES DE AGUA PARA USO FARMACEUTICO:

Las cargas microbianas señaladas en las especificaciones citadas (tabla 1) pueden ser empleadas como referencia para establecer el procedimiento general de tratamiento y/o purificación de agua y cuyo análisis microbiológico al salir de especificaciones, dé paso a la toma de acciones correctivas que deben ser indicadas y corroboradas por el responsable del proceso y el departamento de Control de Calidad.

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA****TABLA VIII****TIPOS DE AGUA PARA USO FARMACEUTICO**

TIPO	METODO DE PREPARACION	APIROGENICA (1)	CARGA MICROBIANA
Agua Purificada	Destilación, métodos de intercambio iónico u ósmosis	NO	No más de 100 UFC Por un 1 ml (mesófilos erobios) Ausencia de patógenos
Agua para la fabricación de inyectables	Destilación u ósmosis inversa	SI	No más de 10 UFC por 100 ml (mesófilos aerobios). Ausencia de Patógenos.
Agua inyectable (2)	Destilación u ósmosis Inversa, esterilización Y empaque	SI	Pasa la prueba de Esterilidad
Agua Bacterios-tática para inyección	Destilación u ósmosis inversa Adicionada de agentes bacteriosostáticos, esterilización y empaque.	SI	Pasa la prueba de Esterilidad
Agua Estéril para Irrigación	Destilación y ósmosis inversa, esterilización y empaque	SI	Pasa la prueba de Esterilidad

- (1) Ausencia de endotóxicas capaces de provocar una reacción fébril.
(2) No adecuada para administración intramuscular a menos que se haya hecho isotónica.

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS****OBJETIVO:**

Evaluar la calidad sanitaria de productos farmacéuticos (materias primas, producto intermedio y Terminado) mediante la investigación de organismos mesofílicos aerobios, hongos filamentosos y levaduras así como la investigación de Microorganismos objetables en dichos productos.

ALCANCE:

Este procedimiento aplica a todas las materias primas que se utilizan como excipientes en la fabricación de medicamentos, así como también en los productos en proceso de formas farmacéuticas líquidas y semisólidas, y a todo el producto terminado (jarabes, soluciones, tabletas, supositorios, cremas y cápsulas).

RESPONSABILIDADES:

- Es responsabilidad del Químico Microbiólogo que este procedimiento se lleve a cabo.
- Es deber del supervisor del área verificar que se cumpla.
- Es obligación del Gerente de Control de Calidad garantizar que se lleve a cabo.

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS****MATERIAL Y EQUIPO:**

- Incubadora de 35 +/- 2°C
- Incubadora de 25 +/- 2°C
- Campana de flujo laminar
- Balanza granataria
- Baño María
- Cajas Petri desechables de 16 X 100 mm
- Frascos lecheros
- Pipetas graduadas de 1, 5, 10 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 mL.
- Gasas estériles.
- Abatelenguas estériles.
- Guantes estériles.

REACTIVOS.

- Buffer de fosfatos pH 7.2
- Cloruro de trifenil tetrazoluim al 1%

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

- Acido tartarico al 10 %

MEDIOS DE CULTIVO:

- Caldo soya tripticaseina con lecitina al 5 % y Tween 20 al 4 % (cs-LT)
- Caldo soya simple (CS)
- Caldo lactosado con lecitina al 5 % y Tween 20 al 4 % (CL- LT)
- Caldo lactosado simple (CL)
- Agar soya tripticaseina (TSA)
- Agar papa dextrosa (PDA)
- Agar cetrimida (C)
- Agar Flo . (F)
- Agar Tech (P)
- Agar Vogel Johnson (VJ)
- Agar deSal y Manitol (SM)
- Agar Eosina azul de metileno (EMB)
- Agar Mc Conkey (Mc)
- Agar Xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)
- Agar Salmonella-Shigella (SS)
- Caldo selenito.

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

- Caldo tetrionato.

PROCEDIMIENTO:

1.- RECOMENDACIONES GENERALES:

- Las muestras deben trabajarse bajo condiciones asépticas.
 - El tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta su incorporación con el medio de cultivo no debe exceder de una hora.⁽⁷⁾
 - Las muestras de prueba deben incubarse a 37°C durante 48 hrs. Para bacterias y a 25°C para hongos.⁽¹⁾
- a) Las muestras utilizadas para cada determinación deberán ser de 10 mL ó 10 g, según sea el caso, tomadas de una muestra compuesta de cuando menos 10 envases del lote.
- b) En términos generales el numero de muestras debe ser representativo del proceso y del lote.
- c) Se recomienda una cantidad de 40 a 50 g ó .mL según sea el caso, para materia prima y/o producto en proceso.⁽²⁰⁾

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

2.- PREPARACION DE LA MUESTRA:

De acuerdo a las características físicas de la muestra elegir el método adecuado para obtener una solución, suspensión ó emulsión sin alterar el número y clase del microorganismo.

Los métodos de preparación del material a investigar se describen a continuación y constituyen la primera dilución del producto (10^{-1}), dilución que puede hacerse con buffer de fosfatos pH 7.2 , caldo digerido de caseína soya tripticaseína-lecitina y tween , caldo soya tripticaseína ó caldo lactosado, ó caldo lactosado-lecitina y tween.

Sólido y líquidos miscibles en agua:

- 1) Pesar ó medir exactamente 10 g ó 10 mL de muestra

Si se trata de un líquido o una suspensión acuosa o hidroalcohólica, que contenga menos del 30 % de alcohol, utilizar como diluyente 90 mL de Caldo soya lecitina-tween (CL - LT) para inactivar conservadores.⁽¹⁾

Si la muestra es un ungüento o cera:

Pesar 10 g de muestra en 90 mL de caldo soya lecitina-tween calentar en un baño de agua a 45°C , para que se licue la muestra, posteriormente proceder a sembrar.⁽¹⁾

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

Líquidos densos

Para muestras densas (suspensiones) que no puedan medirse con pipeta, porque se quede producto adherido a las paredes del material, pesar 10 g de muestra en 90 mL de caldo soya lecitina-tween y 10 g de muestra en 90 mL de caldo lactosado lecitina tween.⁽¹⁾

Si la muestra es un sólido:

Que no se disuelve en el medio de cultivo se deberá moler hasta obtener un granulado, y se diluirá la muestra en 90 mL de caldo lactosado simple.

3.- RECUENTO DE ORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS:

METODO EN PLACA:

Efectuar las diluciones decimales necesarias para que las muestras contengan entre 30 y 300 UFC/mL.⁽¹⁾

Inocular por duplicado 1 mL de cada dilución del producto en cajas de Petri estériles, añadir a cada caja de 15 a 20 mL del medio de agar soya tripticaseína, una vez que se haya agregado al agar soya tripticaseína 0.5 mL de cloruro de trifeníltetrazolium a cada 100 mL de medio de cultivo, listo para usarse previamente esterilizado y mantenido en baño de agua a una temperatura aproximada de 45°C a 48°C.⁽¹⁾

Con movimientos suaves rotatorios, mezclar la alícuota de la muestra con medio de cultivo, evitando derramar el líquido.

PROCEDIMIENTO:

ANÁLISIS DE LÍMITES MICROBIANOS

Permitir que el medio de cultivo solidifique, incubar las placas en posición invertida a 35°C + 2°C , durante 48 hrs..

Después del periodo de incubación contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) , auxiliándose de una lupa .

Determinar las UFC de la placa 1 (UFC₁) y de la placa 2 (UFC₂) calcular el promedio de las UFC con la siguiente ecuación:⁽¹⁾

$$UFC = \left[\frac{\sqrt{UFC_1 + 0.5} + \sqrt{UFC_2 + 0.5}}{2} \right] - 0.5$$

Anotar el promedio de colonias por dilución , e informar el número de UFC por g o mL del producto considerando el factor de dilución de la muestra en el formato correspondiente.

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

4.-RECUESTO DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS:

Efectuar las diluciones decimales necesarias para que las muestras contengan entre 30 y 300 UFC/mL .

Inocular por duplicado 1 mL.de cada dilución del producto en cajas de Petri estériles añadir a cada caja de 15 a 20 mL del medio de agar Papa Dextrosa, previamente esterilizado y mantenido en baño de agua a una temperatura aproximada de 45°C a 48°C.⁽¹⁾

En el momento en que se proceda vaciar el agar a las cajas Petri,, agregar al medio de cultivo 1 mL de ácido tartárico por cada 100 mL de medio, agitar el matraz evitando la formación de espuma y vaciarlo.

Con movimientos suaves rotatorios, mezclar la alícuota de la muestra con en medio de cultivo , evitando derramar el líquido.

Esperar a que se solidifique el medio de cultivo e incubar a 22.5°C + 2.5°C en posición invertida durante 5 a 7 días.

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS****5.- INVESTIGACIÓN DE MICROORGANISMOS OBJETABLES:****5.1 Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus***

A partir del caldo soya tripticaseína o caldo soya tripticaseína lecitina tween que continuación fue sembrado e incubado por 48 hrs, tomar una asada y sembrar por estría cruzada en los siguientes medios de cultivo:

Agar Sal y manitol rojo de fenol y agar Vogel Johnson, para el aislamiento de *St aureus*, incubar durante 48 hrs, observar la morfología colonial y compararlas con las descritas a continuación.

TABLA IX

Características de *Staphylococcus aureus*.⁽²²⁾

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica
Agar Vogel Johnson	Colonias negras rodeadas de una zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Agar Sal Manitol	Colonias amarillas rodeadas de una zona amarilla.	Cocos Gram positivos agrupados en racimos

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS**

Para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir del caldo soya tripticaseina ó caldo soya tripticaseina lecitina tween previamente sembrado e incubado durante 48 hrs, tomar una asada y sembrar por estria cruzada en los siguientes medios de cultivo: Agar cetrimida, agar flo y agar tech, incubar durante 48 hrs y observar la morfología colonial y compararla con la tabla descrita a continuación.

TABLA XCaracterísticas de *Pseudomonas aeruginosa*

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica	Prueba de oxidasa
Agar cetrimida	Colonias verde azulosas , con luz ultravioleta se observan de color verdoso fluorescentes.	Bacilos Gram Negativos	Positiva
Agar tech	Colonias verde azulosas , Con luz ultravioleta se observan de color azul fluorescente	Bacilos Gram Negativos	Positiva
Agar Flo	Colonias incoloras ó amarillentas , con luz ultravioleta se observan color amarillento fluorescente.	Bacilos Gram Negativos	Positiva

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

Confirmación de *Staphylococcus aureus*:

Prueba de Coagulasa:

TÉCNICA:

- 1) Se someten al ensayo de la coagulasa 5 colonias típicas y/o atípicas sobre agar Vogel Johnson.
- 2) Cada una de las colonias elegidas se transfiere con un asa de inoculación estéril en cada caso en un tubo de cultivo con caldo de cerebro corazón y se incuba durante 20 hasta 24 hrs a 37°C.
- 3) El plasma de conejo tratado con EDTA liofilizado se disuelve por adición de 3 ml de agua destilada ó desmineralizada
- 4) Se introducen 0.3 mL de Bactident Coagulase rehidratado mediante una pipeta estéril en un tubo de cultivo estéril.
- 5) Se mezclan cuidadosamente 0.1 mL de cultivo de caldo cerebro-corazón con los 0.3 ml de plasma y se incuba a 37°C en el baño de agua.
- 6) El contenido del tubo se comprueba cada hora respecto a coagulación inclinando lateralmente con cuidado (no agitar ó mover bruscamente).
- 7) El ensayo de la coagulasa se considera como positivo, si el contenido del tubo en mas de tres cuartas partes se presenta como un grumo compacto. En caso de resultado negativo del ensayo tras 4 hrs de incubación se debe continuar incubando el tubo y evaluar de forma concluyente tras 24 hrs de incubación.
- 8) Como control negativo se utiliza una preparación con medio de cultivo cerebro corazón no inoculado, en el cual no deben encontrarse signos de formación de grumos.⁽¹⁷⁾

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

- 9) Como control positivo utilizar la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P .

Si durante este intervalo de tiempo no se observa ningún grado de coagulación , la muestra cumple con los requerimientos de ausencia de *Staphylococcus aureus*.

Confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*:

PRODUCCION DE PIGMENTOS:

Si la morfología colonial de la tabla para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* corresponde con la obtenida en los medios indicados, se debe efectuar la prueba de oxidasa y catalasa.

PRUEBA DE OXIDASA:

Tomar una tira reactiva de Bactident oxidase, y colocar sobre ella una pequeña porción de la colonia sospechosa .

La prueba es positiva si desarrolla un color púrpura en 60 seg.
Emplear como control positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 y como control negativo a *Escherichia coli* ATCC 10536.

Hacer pruebas bioquímicas adicionales, según el procedimiento para su identificación (Estuche de identificación API).

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS**

Identificación de *Salmonella sp* y *Escherichia coli*.

AISLAMIENTO DE *Salmonella sp*

Del caldo lactosado inoculado previamente con la muestra e incubado por 48 hrs a 37°C , resemar 1 mL de cultivo a los siguientes medios de enriquecimiento: 9 mL de medio Caldo Selenito -cisteína, 9 mL de medio caldo tetrionato, mezclar e incubar a 37°C de 18 a 24 hrs.

Tomar una asada de cada uno de los medios y resemar por estría cruzada en los medios de agar Xilosa- Lisina Dexosicolato (XLD) y agar Salmonella - Shigella (SS). Incubar durante 48 hrs.

Observar la morfología colonial y microscópica y compararla con la siguiente tabla:

TABLA XI**Características de *Salmonella sp***

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	Colonias que no modifican el medio, rojas con o sin centro negro	Bacilos Gram Negativos
Agar Salmonella Shigella	Colonias incoloras transparentes con o sin centro negro.	Bacilos Gram Negativos
Agar Fierro Triple azucar	Superficie alcalina (roja) picadura acida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfúrico (negro).	Bacilos Gram Negativos

PROCEDIMIENTO:**ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS****Aislamiento de *Escherichia coli***

A partir del medio caldo Lactosado, aislar resembrando por estría cruzada el medio Agar eosina azul de metileno (EMB) y agar McConkey.

Observar el crecimiento, si la morfología colonial no corresponde con la descrita en la siguiente tabla, la muestra cumple con el requisito de ausencia de *Escherichia coli*.

La presencia de *Escherichia coli* debe confirmarse utilizando pruebas bioquímicas adicionales (estuche API para identificación de Gram (-))

TABLA XII**Características de *Escherichia coli* ⁽¹⁷⁾**

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica
Agar McConkey	Colonias grandes rosas-rojas rodeadas de una zona de precipitación.	Bacilos Gram Negativos
Agar Levine-Azul de Metileno	Colonias pequeñas azul-negro, con brillo metálico de color verde	Bacilos Gram Negativos

PROCEDIMIENTO:

ANALISIS DE LIMITES MICROBIANOS

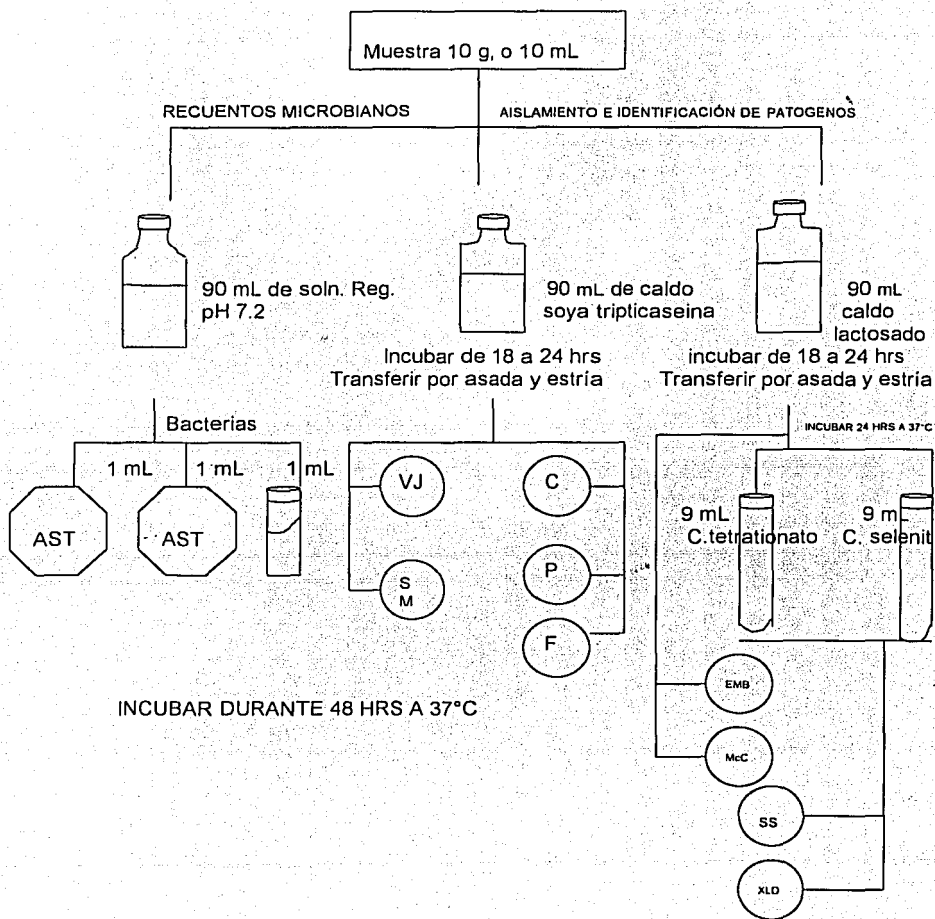
REPRUEBAS:

Para confirmar un resultado dudoso en cualquiera de los procedimientos anteriores, utilizar 25 g o ml de muestra y realizar la prueba nuevamente.

CRITERIOS DE ACEPTACION:

- a) Las muestras analizadas no deben contener una carga bacteriana de mas de 100 UFC/ mL o g.
- b) Las muestras analizadas no deben contener mas de 10 UFC/ mL, o g de carga de hongos.
- c) Si presentan 100 UFC/ mL o g (o más carga bacteriana) de bacterias ó mesofilicos aerobios, se deberá realizar nuevamente la prueba por duplicado para corroborar el resultado.
- d) Si presentan mas de 10 UFC/ mL o g de carga de hongos, se deberá repetir la prueba por duplicado para corroborar el resultado.
- e) Las muestras analizadas no deberán tener presencia de microorganismos objetables, como *St. aureus*, *Pseudomona*, *E. coli*, *S. typhi* y en general ninguna *enterobacteria* que sea patógena para el hombre.
- f) Los testigos negativos del medio de cultivo no deben presentar crecimiento, de lo contrario , se invalida la prueba y se realiza de nuevo.
- g) Los testigos positivos, se tomarán de acuerdo así pasó la prueba de promoción de crecimiento ó no el medio de cultivo, si no pasa la prueba obviamente no se debe usar el medio de cultivo y si se usa, la prueba se invalida.
- h) Si la muestra analizada, se encuentra fuera de especificaciones, es decir con mas de 100 UFC/ ml ó g de carga bacteriana, el producto se rechaza

ESQUEMA DEL ANALISIS MICROBIOLÓGICO PARA PRODUCTOS NO ESTERILES⁽⁷⁾



**PROCEDIMIENTO:
VALORACION MICROBIOLÓGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES**

OBJETIVO:

Verificar la efectividad antimicrobiana que deben cumplir los sanitizantes para ser usados en la planta de producción así como también en el laboratorio de Control Microbiológico, mediante la determinación del porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos cuando se pone en contacto con el sanitizante bajo condiciones de prueba específicas.

ALCANCE:

- Control Microbiológico.
- Producción.

RESPONSABILIDADES:

- Es responsabilidad de Control Microbiológico que este procedimiento se lleve a cabo.
- Es deber del gerente de Control de Calidad verificar que este procedimiento se cumpla.
- Es obligación del departamento de producción utilizar los sanitizantes como se lo indique el departamento de control microbiológico para la sanitización de las áreas.

**PROCEDIMIENTO:
VALORACION MICROBIOLÓGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES**

MATERIAL Y EQUIPO:

- Probetas de 100 mL.
- Pipetas graduadas de 1 mL.
- Matraz erlenmeyer de 250 mL
- Tubos de ensayo de 16 mm X 150 mm.
- Gradillas
- Cajas de petri estériles.
- Incubadora de 25°C
- Incubadora de 37°C
- Vortex

REACTIVOS:

- Agar de Lethen.
- Caldo de Lethen
- Agar cuenta estandar
- Solución salina
- Agar Soya Trypticaseína.
- Agar papa glucosa
- Desinfectante de prueba.

**PROCEDIMIENTO:
VALORACION MICROBIOLÓGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES**

MICROORGANISMOS DE PRUEBA:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P
- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 25619
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Aspergillus niger* ATCC 16404

ANÁLISIS PRELIMINAR:

- Determinar la carga bacteriana de los sanitizantes para verificar que el sanitizante no esté contaminado., Mediante la investigación de microorganismos mesofílicos aerobios y hongos filamentosos.⁽¹²⁾

DESARROLLO:

PREPARACION DE SUSPENSIÓN CELULAR

- Sembrar el microorganismo de prueba en un tubo inclinado de agar soya tripticaseína para microorganismos mesofílicos aerobios y para el hongo sembrar en tubo inclinado de agar papa glucosa, incubar a 37°C para bacterias durante 24 horas y a 25°C para hongos durante cinco días.
- Cosechar los tubos con tres mililitros de solución salina estéril.
- Colocar la suspensión del microorganismo en un matraz Erlenmeyer que contenga 50 mL de solución salina estéril.
- Para cada microorganismo se deberá contar con una suspensión

**PROCEDIMIENTO:
VALORACION MICROBIOLÓGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES**

DETERMINACION DE LA CUENTA VIABLE DE MICROORGANISMOS:

- De cada suspensión de microorganismos que se prepare se realizarán diluciones en placa, tantas como sean necesarias, hasta obtener una placa que se pueda leer entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC/ mL) por mililitro.
- Para el reto del sanitizante se deberá encontrar en que dilución tenemos para bacterias de $75 \text{ a } 125 \times 10^9 \text{ UFC/ mL}$ y para hongos $1 \times 10^5 \text{ UFC/ mL}$.⁽²⁾
- Considerar este valor para el ajuste de la suspensión para las siguientes pruebas

PREPARACION DEL SANITIZANTE DE PRUEBA.

- Preparar el sanitizante a probar según las indicaciones del marbete del proveedor.
- Medir con la ayuda de una probeta 99 mL de solución sanitizante y transferirlos a un matraz erlenmeyer de 250 mL., se contará con un matraz erlenmeyer con solución sanitizante medida (99 mL) para cada microorganismo de prueba, por lo tanto se tendrán 5 matraces para el reto microbiano.⁽²⁾

**PROCEDIMIENTO:
VALORACION MICROBIOLÓGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES**

RETO DEL SANITIZANTE A PRUEBA:

- Agitar vigorosamente el matraz que contiene la solución sanitizante y agregar inmediatamente el inóculo de 1 ml de la suspensión celular que contenga la carga bacteriana entre 75 a 125×10^9 UFC/ mL.
- Evitar tocar las paredes y cuello del matraz que contiene la solución sanitizante con la pipeta de inoculación.
- Agitar nuevamente el matraz para que con el movimiento residual del líquido facilite la dispersión del microorganismo esto será durante 30 segundos.
- Al transcurrir el tiempo (30 segundos) transferir inmediatamente una alícuota de 1 ml de esta solución a 9 mL de caldo de Lethen.
- Mezclar vigorosamente con la ayuda del Vortex.
- Esto deberá hacerse para cada microorganismo de prueba, excepto para el hongo, que deberá agitarse en contacto con la solución sanitizante durante 5, 10 y 15 minutos en cada tiempo se deberá tomar una alícuota de 1 mL y será depositada en un tubo de ensayo que contenga 9 mL de caldo de letheen, de esta manera el hongo deberá tener 3 tubos de caldo uno para cada tiempo.
- Transferir alícuotas de 1 mL y 0.1 mL por duplicado en cajas de Petri estériles y a cada caja adicionar entre 15 a 25 mL de agar de Lethen.
- Homogeneizar el medio de cultivo con movimientos rotatorios, dejar que solidifique e invertir las placas para que sean incubadas durante 48 horas a 37°C para bacterias y durante 5 días a 25°C para hongos.

PROCEDIMIENTO:

VALORACION MICROBIOLÓGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES

DETERMINACION DE LA CUENTA VIABLE:

- De la dilución obtenida para cada microorganismo en donde se tienen las cuentas requeridas de los microorganismos para el reto microbiano del sanitizante, realizar las diluciones necesarias para obtener en la cuenta en placa entre 30 a 300 UFC/ mL y determinar si el microorganismo retado está viable y si se cuenta con la concentración en la suspensión requerida para la prueba.⁽²⁾
- Estas cajas deberán ser incubadas junto con las cajas del reto microbiano del sanitizante que se puso a prueba a la temperatura y tiempos requeridos para cada microorganismo, estos serán los controles positivos.
- Transcurrido el periodo de incubación, contar las colonias de las placas tanto del control positivo como del sanitizante probado.
- Reportar el porcentaje de reducción en función del número de unidades formadoras de colonias del control positivo y el número de unidades formadoras de colonias obtenido después del contacto con el sanitizante, para que la prueba sea válida el número de UFC/ ml de bacterias del control positivo deberá encontrarse entre $75 \text{ a } 125 \times 10^9 \text{ UFC/ mL}$ y de $1 \times 10^5 \text{ UFC/ mL}$ para hongos.⁽¹¹⁾

**PROCEDIMIENTO:
VALORACION MICROBIOLOGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES**

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE MORTALIDAD DEL MICROORGANISMO

- Se determina el promedio de la carga bacteriana de las cajas de petri sembradas para cada microorganismo, tomando la dilución ya sea de 1 mL ó de 0.1 mL, el criterio que se seguirá para y tomar en cuenta una u otra dilución será de aquellas cajas que se puedan leer entre 30 y 300 UFC.
- Si se tomaran en cuenta la cajas de la dilución de 0.1 mL el promedio de las unidades formadoras de colonias deberá ser multiplicado por 10, ya que se tiene una dilución decimal.

Se toma en cuenta la concentración real de la suspensión del microorganismo para determinar la efectividad del sanitizante.

Así por ejemplo si se tiene un promedio de 60 UFC/ mL del microorganismo de prueba y se cuenta con una carga bacteriana inicial que nos reporta el testigo positivo de 123×10^9 UFC/mL se tiene lo siguiente:

$$\begin{array}{l} 123 \times 10^9 \text{ UFC/mL} \longrightarrow 100 \% \\ 60 \text{ UFC/ mL} \longrightarrow X \end{array}$$

De este modo tenemos que: $\frac{(60 \times 100)}{123 \times 10^9} = 0.00002$ % de supervivencia

Así se resta el porcentaje de 0.00002 % a 100 % y tenemos un porcentaje de mortalidad de 99.99998 %.⁽²⁾

**PROCEDIMIENTO:
VALORACION MICROBIOLÓGICA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES**

CRITERIOS DE ACEPTACION:

- Para que la prueba sea válida el número de unidades formadoras de colonias por mililitro deberá estar comprendida entre 75 a 125×10^9 UFC/ mL para bacterias y de 1×10^5 para hongos en la cuenta control.
- Para que el sanitizante cumpla con su efectividad deberá contar con un porcentaje de mortalidad del 99.999% de reducción de la población microbiana con 30 segundos de contacto bacteriano y 5, 10 y 15 minutos de contacto para el hongo.

**PROCEDIMIENTO:
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000**

OBJETIVO

Contar con un procedimiento para el control ambiental en áreas limpias clase 100 000, que reflejen la carga biológica real existente en cada área; para tomar las acciones correctivas pertinentes y prevenir problemas de contaminación en los productos fabricados

Conocer la responsabilidad de cada departamento involucrado en los monitoreos ambientales, así como conocer las técnicas utilizadas, frecuencias, límites de alerta y aceptación y puntos o zonas de muestreo

ALCANCE

Este procedimiento aplica para las siguientes áreas:

- Área de Producción.
- Área de almacén.
- Área de Mantenimiento.
- Área de Validación
- Área de Microbiología.

RESPONSABILIDADES

- 1.- Es responsabilidad del área de Microbiología llevar a cabo el programa de monitoreo ambiental en las áreas de producción y almacenes.
- 2.- Es deber del área de Microbiología informar por escrito a las áreas correspondientes cuando un resultado se encuentre fuera de especificación o en los límites de alerta.

**PROCEDIMIENTO:
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000**

- 3.- Es responsabilidad del departamento de producción emitir una acción correctiva, cuando el reporte de Control Microbiológico ambiental no sea satisfactorio.
- 4.- Es responsabilidad del departamento de Validación establecer los límites de alerta y límites de aceptación.
- 5.- Es responsabilidad del departamento de Mantenimiento mantener en buen estado la cascada de filtración, para que se tenga una inyección de aire apropiada.

MATERIALES

- Atomizador
- Estufa de incubación.
- Hisopos estériles.
- Tubos con buffer de fosfatos pH 7.2 con lecitina y tween c/ 10 ml cada uno.
- Placas de contacto de TSA con lecitina
- Tiras para muestreador de aire de TSA con lecitina.
- Gasas
- Guantes.
- Cofias.
- Cubrebocas.
- Muestreador centrífugo de aire

MONITOREO AMBIENTAL DEL AIRE

El Químico Microbiólogo realizará el monitoreo ambiental en los puntos designados como puntos críticos en el proceso de manufactura.⁽⁶⁾

**PROCEDIMIENTO:
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000**

Un punto crítico está definido como aquel en el que en algún momento se encuentre expuesto el producto. ⁽⁸⁾

El principio de operación del muestreador centrífugo de aire es depositar la carga de microorganismos del aire dentro de un medio de cultivo; las partículas contenidas en el aire son impactadas por la fuerza de la centrifuga dentro de un medio de agar y son detectadas después de la incubación de 48 horas a 37°C para bacterias y a 25°C durante 5 días para hongos filamentosos y levaduras.

Una vez hecho el conteo de unidades formadoras de colonias se multiplica por 25, que es el factor de conversión para así tener las unidades formadoras de colonias por metro cúbico (UFC/m³).

PASO 1

Sacar la tira del empaque original, tomarla de los extremos de tal manera que no se tenga contacto con el medio de cultivo, y colocarla inmediatamente dentro del cabezal del muestreador centrífugo de aire, hasta que se encuentre dentro toda la tira.

PASO 2

Una vez colocada la tira en el muestreador, encender el equipo presionando el interruptor ON - OFF, colocándolo en la posición ON de encendido, colocar el muestreador centrífugo de aire cerca del punto crítico que se vaya a monitorear, durante un minuto, que es el tiempo estandarizado con el cual, se tiene un factor de conversión para determinar las UFC/m³.

PASO 3

Rotular la tira con la clave del área muestreada, el punto muestreado y la fecha de muestreo.

**PROCEDIMIENTO:
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000**

PASO 4

Incubar las tiras muestreadas durante 48 hrs. A 37°C , al cabo de este tiempo marcar las colonias que se hayan desarrollado con un marcador indeleble en la tira de plástico que contiene el medio de cultivo, de esta manera se tiene la cuenta de mesofílicos aerobios, posteriormente reincubar las tiras durante tres días más a 25°C para la cuenta de hongos filamentosos y levaduras; al concluir este tiempo se vuelen a marcar las unidades formadoras de colonias que se hayan desarrollado en este tiempo.

PASO 5

EL número de colonias obtenida para bacterias como para hongos y levaduras se calculará por separado de la siguiente manera:

$$\text{UFC/m}^3 = \frac{\text{Colonias en la tira de agar X 25}}{\text{Tiempo de muestreo (1 min)}}$$

Es decir que: $\text{UFC/m}^3 = \frac{\text{Colonias de bacterias en la tira de agar X 25}}{1 \text{ minuto}}$

$$\text{UFC/m}^3 = \frac{\text{Colonias de hongos filamentosos y levaduras X 25}}{1 \text{ minuto}}$$

PASO 6

Reportar en el formato correspondiente de acuerdo al área que se monitoree (ejemplo tableteadora Stokes, tableteadora Fette, Mezclador de listón, mezclador de pantalón etc.)

PROCEDIMIENTO:

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000

MONITOREO AMBIENTAL DE SUPERFICIES

MUESTREO POR HISOPO

Este tipo de muestreo se utilizará solo para superficies irregulares tales como: Punzones, agujas dosificadoras, guantes, etc. debido a que este modo de muestreo es más cualitativo que cuantitativo.

Para realizar este muestreo se deberá contar con tubos de ensayo que contengan 10 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 con lecitina al 5 % y tween 20 al 4% estériles, para que de esta manera se inactive el sanitizante que pudiera haberse quedado en las superficies, también se requerirá de hisopos estériles.⁽⁸⁾

PASO 1

Destapar el tubo de ensayo que contiene el medio de transporte (buffer de fosfatos pH 7.2 con lecitina y tween), impregnar el hisopo estéril de esta solución y proceder a hisopar la superficie deseada, posteriormente introducir el hisopo dentro del tubo que se ocupó para impregnar de solución el hisopo tapanlo con su tapón de rosca y rotularlo con la clave del punto muestreado, así como también del área muestreada y la fecha, agitar vigorosamente el tubo y sembrarlo antes de que transcurran 20 minutos después de tomada la muestra.

PASO 2

Para sembrar el hisopo se toma una alícuota de un mililitro por duplicado del medio de transporte que contiene al hisopo muestreado y se coloca 1 mL en un tubo que contenga 9 mL de caldo soya, para búsqueda de patógenos y el otro mililitro para una caja de Petri, para hacer el conteo de microorganismos, agregar a las cajas aproximadamente 21 mL de agar soya tripticaseína, incubar durante 48 hrs a 37°C y al fin de este tiempo hacer el conteo de mesófilos aerobios evitando que la caja no se destape

**PROCEDIMIENTO:
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000**

y reincubar durante 3 días más a 25°C para realizar el conteo de hongos filamentosos y levaduras.

Si el caldo soya a las 48 hrs de incubación a 37°C presenta turbidez, se sembrará en medios selectivos para observar si existe el crecimiento de colonias características de patógenos.

Si el caldo soya tripticaseína no presenta turbidez no sembrar y reportar como negativo.

Reportar en el formato correspondiente de acuerdo al área correspondiente.

MUESTREO DE PLACAS POR CONTACTO

Es un apropiado análisis cuantitativo para monitoreo ambiental, que se encuentra en unidades desechables y son usadas en áreas con superficies lisas, ya que es una placa plana, contiene agentes inactivantes para los sanitizantes que se utilizan, la ventaja que este método ofrece, es que en el instante en que se muestrea el punto, queda automáticamente sembrado.

PASO 1

Sacar la placa de su envase original y colocarla en el punto a muestrear, haciendo una ligera presión sobre la misma y el punto muestreado, levantar la placa e introducirla nuevamente a su empaque de plástico, limpiar con una gasa estéril impregnada de alcohol isopropílico al 70% el punto muestreado, evitando que queden restos de agar en la superficie muestreada y que este se pueda contaminar.

PASO 2

Rotular la placa con la clave del área y del punto muestreado, y fecha de muestreo. Incubar las placas durante 48 hrs a 37°C y proceder a hacer el

PROCEDIMIENTO:**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000**

conteo de bacterias, marcando las colonias con un marcador indeleble, y reincubar las placas por 3 días más para hongos y levaduras a 25°C.

Al fin de este tiempo determinar el número de bacterias y el número de hongos y levaduras.

Reportarlo en el formato correspondiente.

Los límites de aceptación de partículas viables y límites de alerta serán los siguientes de acuerdo a los criterios que marca la norma NOM 059 SSA1 y el curso de Validación de Sistemas de Control Ambiental de Franco de Vecchi.⁽²⁰⁾

TABLA XIII**CRITERIOS PARA EL MONITOREO DE PARTICULAS VIABLES**

TIPO DE MUESTREO	CLASE DE ÁREA	LIMITES DE ALERTA	DE LIMITES DE ACEPTACIÓN
MUESTREADOR CENTRÍFUGO DE AIRE	100 000	85 UFC / m ³	< 100 UFC/m ³
PLACA DE CONTACTO	100 000	20 UFC	< 25 UFC
HISOPO	100 000	20 UFC	< 25 UFC

**PROCEDIMIENTO:
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASE 100 000**

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Si los monitoreos ambientales se encuentran dentro de la especificación de límites de alerta, solo se emitirá el reporte de evaluación del área quedando comprobado de esta manera que la limpieza y sanitización del equipo y del área fueron efectivas, así como que la inyección de aire está llevándose a cabo adecuadamente, y que el personal se está comportando adecuadamente dentro de las áreas productivas.

Si los resultados obtenidos se encuentran en los límites de alerta, se emitirá un reporte al departamento involucrado (producción) para que tenga en consideración que es necesario se tomen medidas más eficaces, para limpieza y sanitización de las áreas así como del comportamiento del personal dentro de ellas.

Si los resultados obtenidos se encuentran fuera de especificación de acuerdo a los límites de aceptación, se emitirá el reporte correspondiente y se le hará hincapié al supervisor del área de la necesidad de emitir una acción correctiva para evitar que nuevamente se vuelva caer en contaminaciones microbiológicas que puedan afectar la calidad de los productos que se fabrican.

Esta acción correctiva será inmediata y el departamento de microbiología deberá corroborar que se llevó a cabo y que esta fue eficaz. Esto se determinará con un nuevo monitoreo ambiental, para comprobar la carga de partículas viables.⁽¹⁸⁾

GRAFICAS DE RESULTADOS

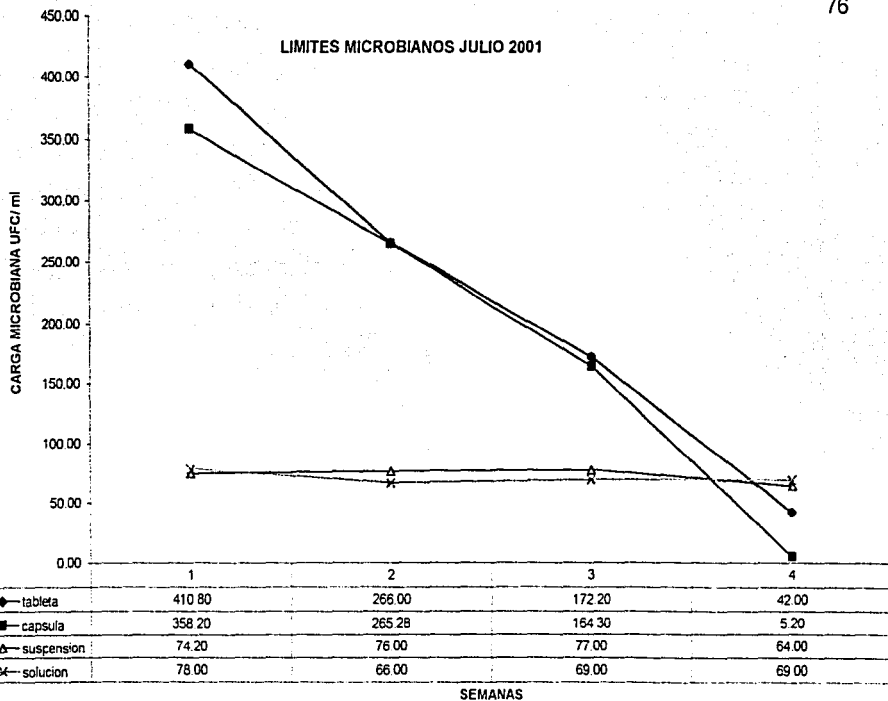
A continuación se presentan las gráficas de los resultados obtenidos en los productos siguiendo las buenas prácticas de manufactura y sobre todo tomando en cuenta las observaciones que hacía el departamento de control Microbiológico al de producción.

Se tomaron en cuenta los valores obtenidos de los límites microbianos de productos no estériles, tanto los que indica la bibliografía para que se les realice esta prueba, como es el caso de la suspensión y la solución, así como también a las formas farmacéuticas de tabletas y cápsulas que la bibliografía no contempla para que se realice esta prueba.

Se tomaron promedios de las semanas en las que se llevó a cabo este estudio, empezando con el mes de Julio del 2001 en donde, se tienen 4 semanas de datos.

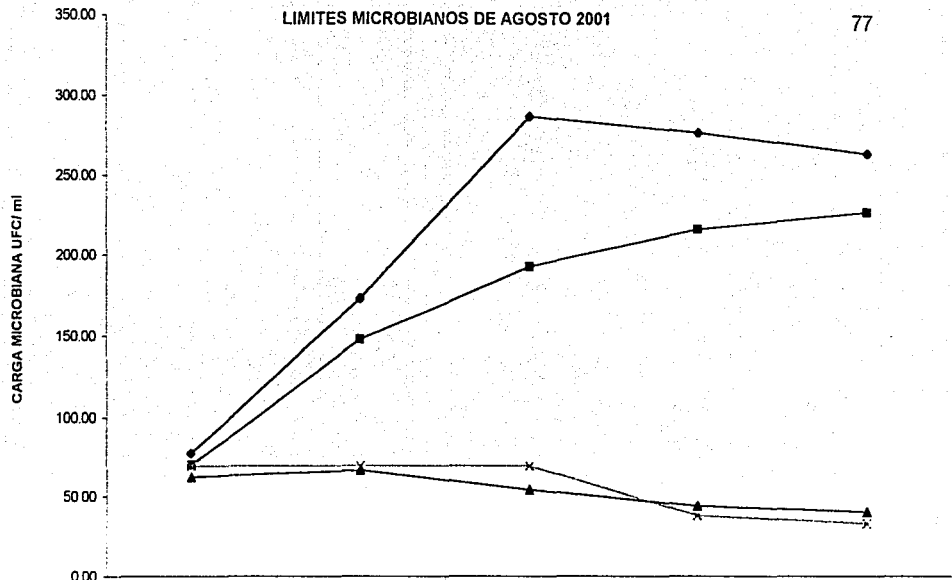
En las formas farmacéuticas líquidas que pide la autoridad se realice la prueba de límites microbianos se mantuvieron constantes en sus cargas microbianas durante todo el tiempo, pero las cargas microbianas de las formas farmacéuticas sólidas solo se encuentran dentro de especificación en la última semana de Julio y que casualmente coincide con una limpieza y sanitización exhaustiva que se realizó durante la fabricación del producto, de la misma manera sucede en los siguientes meses de Agosto, Septiembre, Octubre, Noviembre y Diciembre del 2001.

Sin embargo las cargas microbianas de los productos líquidos y sólidos ambos presentan una disminución considerable en su carga bacteriana al paso del tiempo, en Enero del 2002, se observa aún más la disminución de la carga microbiana, y para Marzo del 2002 se presentan cargas microbianas para los productos no estériles de formas farmacéuticas sólidas (cápsulas y tabletas) por debajo de los límites de aceptación que marca la bibliografía para formas farmacéuticas líquidas, es decir que se encontraron cargas microbianas de hasta menos de 10 UFC/ g.



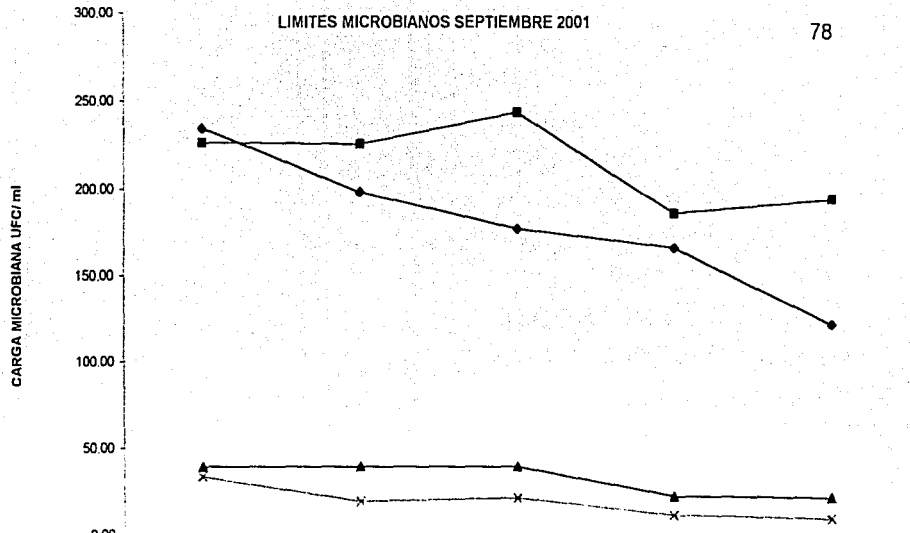
LIMITES MICROBIANOS DE AGOSTO 2001

77



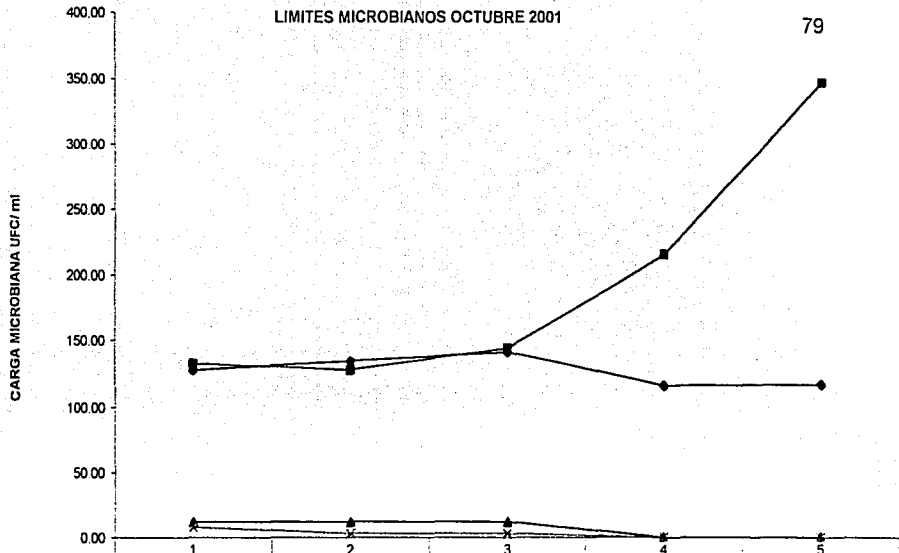
	1	2	3	4	5
● TABLETAS	77.40	173.10	286.60	277.00	264.00
■ CAPSULAS	69.60	147.40	192.40	216.00	227.00
▲ SUSPENSION	62.00	66.00	54.00	44.00	40.00
× SOLUCIONES	69.00	69.00	69.00	38.00	33.00

SEMANAS



◆ TABLETAS	234.00	198.00	177.00	166.00	121.00
■ CAPSULAS	226.00	225.00	243.00	186.00	194.00
▲ SUSPENSIONES	39.00	39.00	39.00	22.00	21.00
× SOLUCIONES	33.00	19.00	21.00	11.00	9.00

SEMANAS



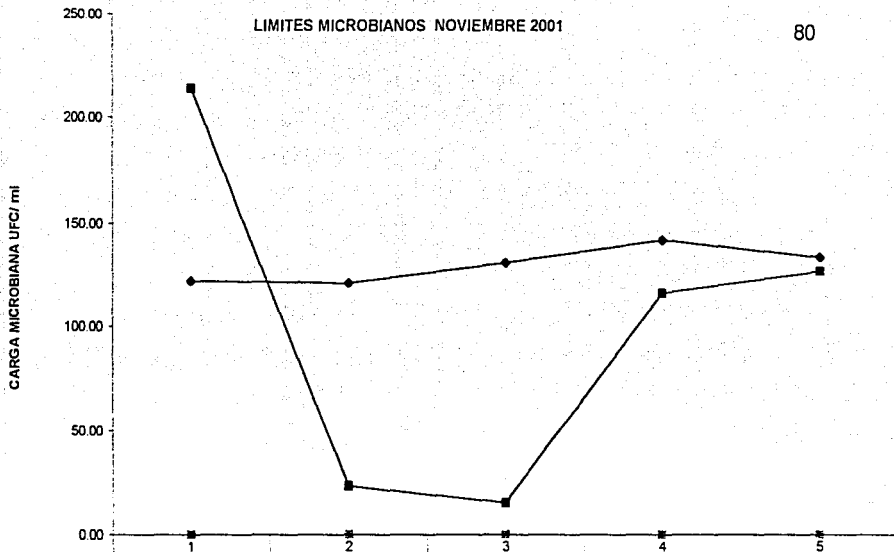
◆ TABLETAS	127.00	134.00	141.00	116.00	117.00
■ CAPSULAS	132.00	127.00	144.00	215.00	347.00
▲ SUSPENSIONES	12.00	12.00	12.00	0.00	0.00
× SOLUCIONES	8.00	3.00	3.00	0.00	0.00

SEMANAS

ESTA TESIS NO SALIÓ DE LA BIBLIOTECA

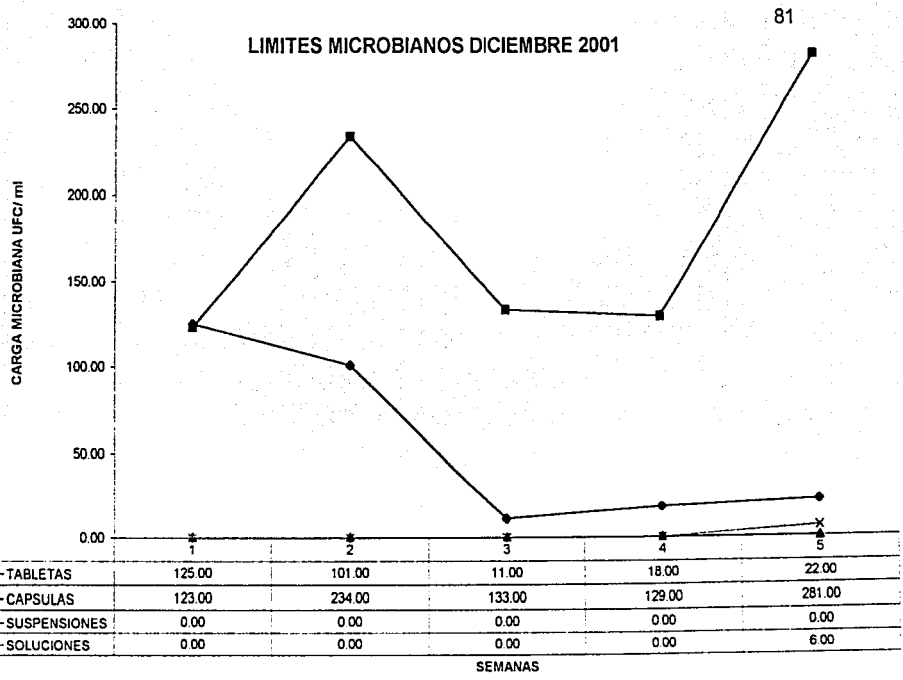
LIMITES MICROBIANOS NOVIEMBRE 2001

80



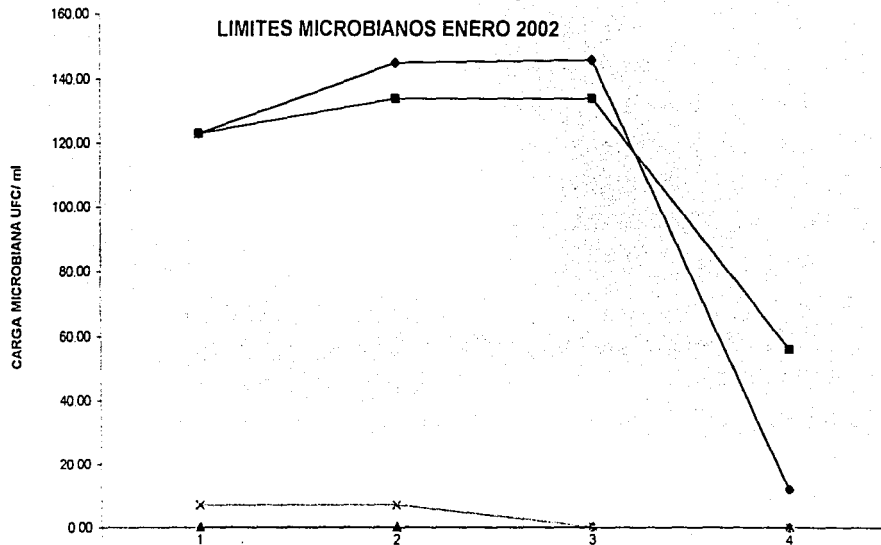
	1	2	3	4	5
◆ TABLETAS	122.00	121.00	131.00	142.00	134.00
■ CAPSULAS	214.00	23.00	15.00	116.00	127.00
▲ SUSPENSIONES	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
✕ SOLUCIONES	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

SEMANAS



SEMANAS

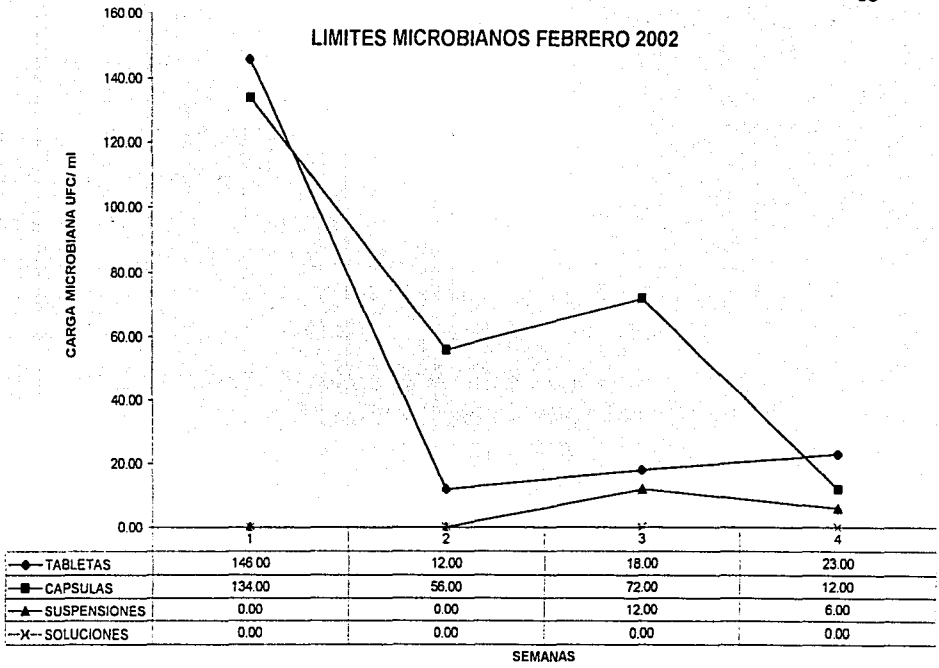
LIMITES MICROBIANOS ENERO 2002

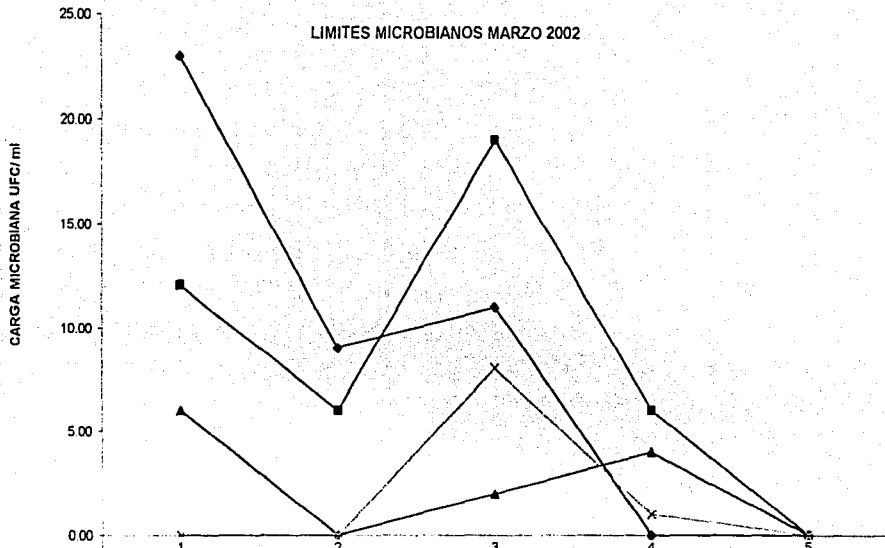


●	TABLETAS	123 00	145 00	146 00	12 00
■	CAPSULAS	123 00	134 00	134 00	56 00
▲	SUSPENSIONES	0 00	0 00	0 00	0 00
×	SOLUCIONES	7 00	7 00	0 00	0 00

SEMANAS

LIMITES MICROBIANOS FEBRERO 2002





● TABLETAS	23.00	9.00	11	0	0
■ CAPSULAS	12.00	6.00	19	6	0
▲ SUSPENSIONES	6.00	0.00	2	4	0
× SOLUCIONES	0.00	0.00	8	1	0

SEMANAS

DISCUSION

Para realizar el Control microbiológico de productos no estériles se necesita de la experiencia y del apoyo del Químico Farmacéutico Biólogo, ya que se requiere de todos los conocimientos teóricos que se aprenden durante toda la carrera así como del desarrollo de habilidades y del criterio para decidir que determinación tomar en un caso dado.

Las posibles causas de error que pueden presentarse en un laboratorio de Control Microbiológico pueden deberse a diversos factores que intervienen en el desarrollo de un análisis y que afectan de manera importante al producto terminado por lo que es necesario empezar con lo básico y elemental desde la preparación de los medios de cultivo.⁽²²⁾

Es de vital importancia garantizar que la preparación de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio de Control Microbiológico, tengan los atributos de calidad en todos los sentidos y que permitan al Químico Farmacéutico Biólogo demostrarlo mediante los análisis de promoción de crecimiento, afirmando así que el medio de cultivo está apto para ser usado, es decir que nos garantiza una respuesta adecuada.

Si al sembrar 100 UFC de microorganismos y al incubarlos tendremos como resultado 100 UFC tal vez con un 5 por ciento de error mas o menos, pero no me aumentará mas de este porcentaje la carga bacteriana ni la disminuirá, también nos permitirá observar si el crecimiento del microorganismo presenta las características esperadas, por ejemplo si en un agar de EMB (Eosina Azul de Metileno) se siembra una *E. coli*, las colonias que se espera que crezcan serán de color negro con un brillo verde metálico, si esto no se obtiene, el resultado no es el esperado y por lo tanto el medio de cultivo se rechaza ya que no es apto para la evaluación de microorganismos para el cual fue preparado.

De ahí que es necesario hacer notar que si desde un principio no se cuenta con los medios de cultivo aprobados para realizar todas las pruebas que garanticen la calidad microbiológica de productos farmacéuticos no estériles, los análisis que se le realicen al producto farmacéutico no será confiables ya que podremos tener falsos positivos ó falsos negativos y por lo tanto el Control de Calidad microbiológico perderá credibilidad al no estar seguros de lo que se esté reportando, por este motivo se deben seguir las técnicas y

DISCUSION

normas microbiológicas para evitar complicaciones innecesarias y así no se verán afectados los tiempos de análisis que, son muy largos, y debido a que cuando existe duda se recomienda la repetición del mismo, el tiempo de análisis será demasiado extenso y esto afectará la economía de la empresa.

El método utilizado para la esterilización de los medios de cultivo, es el de vapor, en el cual se utilizan autoclaves u ollas de presión con manómetro, es importante verificar que los ciclos de esterilización que se tienen son los adecuados, tomando en cuenta que este equipo sólo debe ser usado si está validado, ya que al validarse se determinan los puntos fríos del equipo, que son aquellos en donde no se alcanza la temperatura de esterilización, y por lo tanto nos afecta la calidad del medio de cultivo, ya que puede no cumplirse el ciclo de esterilización y dejar los medios contaminados., para evitar este tipo de errores, se recomienda el uso de indicadores biológicos para calor húmedo, que hoy en día ya se puede determinar si un ciclo de esterilización fue adecuado si al terminó de la incubación el resultado de la prueba de esterilidad del bioindicador esta negativa, es decir sin crecimiento.

Debido a que el agua se ha denominado y con justa razón como la materia prima universal, se deberá contar con un control muy estricto de la misma, para evitar contaminaciones posteriores en los productos de fabricación, ya que este es un sistema crítico y el Químico farmacéutico Biólogo, deberá mantener la calidad de este sistema, monitoreando continuamente varios puntos de muestreo del sistema de agua y analizando microbiológicamente en que puntos se tienen mas problemas de contaminación, para dar un mantenimiento mas profundo y continuo y de esta manera asegurar la calidad microbiológica del agua, si esta se asegura, se reducirán en gran medida las posibles causas de contaminación en los productos farmacéuticos no estériles ya que como se mencionó anteriormente el agua es la materia prima universal y la llevan casi todos los preparados farmacéuticos y como el agua es un sistema muy susceptible de que se contamine es necesario sé monitoree y analice continuamente evitando el incremento en la carga bacteriana del sistema, así como la incorporación de microorganismos patógenos que nos generen problemas en la fabricación de los productos.

Con los análisis microbiológicos del agua obtenidos el Q.F.B. podrá determinar un programa de mantenimiento y limpieza del sistema de agua así como dictaminar un límite de alerta que nos garantice que el agua que se ocupe en la fabricación de los productos farmacéuticos tiene la calidad

DISCUSION

requerida por especificación y que no rebasará el límite aceptado de las autoridades sanitarias.

Por lo tanto con el límite de alerta propuesto le ahorrará al departamento de producción muchos problemas, ya que cuando un análisis del agua demuestre que se tiene una contaminación que se encuentre dentro de especificación, pero en el límite de alerta, se deberá dar mantenimiento y limpieza al sistema de purificación del agua. Con esto se tendrá la seguridad que el agua es de la calidad requerida para su uso.

Es indiscutible la trascendencia que estos análisis de agua tienen en la industria farmacéutica y que debiera darse la importancia que estos merecen, ya que por lo general el análisis mas respetado por los departamentos que conforman una industria farmacéutica es el reportado por el laboratorio de Control Químico.

El análisis de límites microbianos en los productos no estériles no ha tomado la relevancia que merece, sin embargo al menos las autoridades sanitarias ya han fijado un límite microbiano para productos no estériles de formas farmacéuticas líquidas y semisólidas, tal es el caso de soluciones, suspensiones, jarabes, ungüentos, cremas, supositorios, óvulos etc. pero aún y con esta norma emitida por las autoridades competentes, no se ha inculcado por decirlo de alguna manera al departamento de producción, que para que tenga medicamentos seguros y confiables en su departamento, deberá también cumplir con ciertas normas que están ligadas a la fabricación de su producto y que estas deberán seguirse de acuerdo a las indicaciones del Q.F.B. del laboratorio de Control Microbiológico.

Dado que el departamento de producción tiene como meta producir y los únicos que pueden de alguna manera detener la producción, son los departamentos que entregan resultados inmediatos y que al fin de cuentas son los que deciden en un momento dado si la manufactura del medicamento es correcta ó no, por lo que producción y control químico siempre se encuentran en continuas luchas, pero en comunicación y de esta manera producción se ve en la necesidad de estar enterado por los Químicos de control físico-químico, si su producto es aprobado o rechazado, por valoración, disolución, desintegración, uniformidad de contenido, determinación, de pesos o volúmenes según sea el caso, pero es poco importante si está contaminado por microorganismos que puedan afectar la salud del paciente.

DISCUSION

Hoy en día la ardua tarea del Químico Farmacéutico Biólogo, es concientizar al departamento de manufactura que al igual que el análisis de Control Químico, también es importante el análisis de Control Microbiológico, es importante mencionar que para formas farmacéuticas sólidas como es el caso de tabletas orales, tabletas vaginales, cápsulas y grageas no se realizan en la actualidad los análisis de límites microbianos, ¿por qué razón? No importa que se contaminen, ¿esto no es atender contra la salud del paciente?, probablemente se tiene la idea de que el paciente a veces ingiere alimentos ó bebidas que están sumamente contaminadas por una gran variedad de microorganismos, y se hace caso omiso de las afecciones que estos alimentos o bebidas puedan ocasionar en el paciente, entonces ¿por qué se tiene que tener un límite microbiano para productos no estériles?, hablando particularmente de estos productos y peor aún para el caso de formas farmacéuticas sólidas en donde ni las autoridades que nos rigen en materia de fabricación de productos para uso y consumo humano no normatizan que todos los productos que se fabriquen en este ramo, deban cumplir con alguna especificación impuesta, ya que de otra manera, se maneja como: este análisis no es requerido, por la Secretaría de Salud, ni por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, así es que para que se gasta dinero invirtiendo en este tipo de análisis, o para que perdemos tiempo de horas hombre del Químico analista, si esta prueba no es requerida no tiene porque hacerse, con todo esto y las excusas antes mencionadas, es difícil agregar mas parámetros a las especificaciones de los productos farmacéuticos no estériles para uso y consumo humano, en las gráficas que se presentan en este trabajo se detecta inmediatamente la importancia y relevancia de la microbiología sobre todo en la industria farmacéutica, para formas farmacéuticas líquidas como es el caso de soluciones y suspensiones la carga microbiana se mantiene dentro de especificación es decir no mas de 100 UFC/ mL, pero para el caso de tabletas y cápsulas (Formas farmacéuticas sólidas) no importa si estas están dentro o fuera, porque simplemente no hay especificación.

Sin embargo se observó que al instruir a la gente de producción, para que realizará limpiezas en sus áreas mas continuamente y usara un determinado tipo de sanitizante el cual debe ser rotado para no crear resistencia en los microorganismos, las cargas microbianas fueron disminuyendo con el tiempo, hasta encontrarse dentro de los límites de especificación que nos marcan las normas que nos rigen.

Cabe mencionar que las cargas bacterianas de los productos analizados en promedio bajaron significativamente sobre todo en las formas farmacéuticas sólidas, ya que para las formas farmacéuticas líquidas, como ya existían

DISCUSION

antecedentes de límites microbianos se continuó trabajando de la misma manera que antes, pero para las formas farmacéuticas sólidas hubo un cambio muy especial y que deja ver que sí se pueden obtener límites microbianos aceptables y que si se siguen las indicaciones dadas por el Q.F.B. de control Microbiológico, para eliminar la contaminación microbiana no tendrán preocupación de que si el producto vaya contaminado o no.

Por lo tanto la experiencia y habilidad del Q.F.B. es necesaria para que al realizar una prueba de reto de sanitizantes, se lleve a cabo sin problemas y se pueda elegir de acuerdo a los resultados obtenidos en este análisis que sanitizantes son mas convenientes para ser usados para la desinfección de las áreas de producción y para el área de siembra de control Microbiológico, es recomendable que al hacer el reto microbiano de los sanitizantes se realice con los microorganismos que marca la bibliografía (Norma IMSS y AOAC)

Pero que también se realice con un microorganismo típico que se encuentre dentro de las áreas productivas, como es el caso del *Bacillus subtilis*, que generalmente se encuentra en el polvo y la mugre y que como esporula es difícil de erradicar, para así garantizar una sanitización exhaustiva y por lo tanto una considerable disminución en la carga microbiana de las áreas, que si no es para esterilizar, pues como su nombre lo dice es un sanitizante, al menos elimine la mayor cantidad posible de microorganismos, y que de esta manera al calificar las áreas de producción realizando monitoreos ambientales para partículas viables, estas se encuentren dentro de especificación para áreas de fabricación clase 100 000 que son áreas valga la redundancia para la fabricación de productos farmacéuticos no estériles

Es importante mencionar que esto no lo logra solamente el sanitizante, sino que también va ligado a ello la cascada de filtración que lleva físicamente la inyección de aire para esas áreas y que además cumplen con los cambios de aire por hora y una presión diferencial determinada para las áreas, ya sea de presión positiva por ejemplo para áreas líquidas y de presión negativa para áreas de sólidos.

Es menester hacer mención que para realizar un monitoreo ambiental microbiológico o de partículas viables se debe contar con el criterio del Q.F.B. para saber que puntos son críticos y que puedan afectar la calidad del producto, de esta manera el Q.F.B. determina cuales son los puntos de muestreo y cuáles serían los límites de alerta que son diferentes a los límites de aceptación, para cada área en particular.

DISCUSION

Por último la resiembra de cepas debe realizarse para poder contar con testigos positivos, primero para saber si el medio de cultivo esta funcionando adecuadamente, al obtener los crecimientos microbianos esperados y segundo para comparar estos crecimientos con controles positivos, así también para al realizar las pruebas de reto microbiano saber con que potencia actúa el sanitizante para eliminar microorganismos patógenos, y cargas bacterianas altas.

Como se puede observar los análisis microbiológicos que deben realizarse en la industria farmacéutica, son varios y cada vez aparecen mas factores que deben ser cuidados para evitar complicaciones innecesarias a los medicamentos fabricados.

Todos los análisis microbiológicos, van ligados, el control microbiológico es como un área de producción pequeña en donde, los medios de cultivo son nuestras materias primas con las que vamos a fabricar y si esta se encuentran mal, el resultado obtenido no será satisfactorio, si en el proceso de fabricación no se hace el pesado adecuado, o si no se lleva a cabo el ciclo de esterilización, o no pasa la prueba de promoción de crecimiento o está contaminado el medio de cultivo, los resultados obtenidos serán invalidados.

Sí a las áreas productivas no se les realiza monitoreos ambientales constantemente para saber en que condiciones de producción están trabajando, se obtendrán resultados desfavorables ya que el departamento de producción no sabría si sus áreas se encuentran contaminadas o no y esto traería por consecuencia productos no estériles de dudosa calidad.

CONCLUSIONES

- 1.- Un laboratorio farmacéutico debe contar con personal profesional capaz de estudiar, diseñar, adaptar desarrollar, validar e implantar la mejor metodología, que garantice la buena calidad de sus productos.
- 2.- Uno de los principales apoyos que hay para desarrollar el trabajo de microbiología es la que se transmite por experiencias, debido a que hay muy poca información bibliográfica al respecto, y es aquí donde el Q.F.B. debe tomar decisiones y criterios en las técnicas analíticas a seguir.
- 3.- En el diseño de la metodología analítica se debe tener presente que en el quehacer microbiológico existen riesgos que, a veces pueden ser muy altos, por lo tanto deben también estudiarse las precauciones que reducen dichos riesgos y consignarlas por escrito afín de que se implementen y se cumplan al ejecutar el método analítico diseñado.
- 4.- Es de gran importancia verificar la calidad microbiológica de los productos, para determinar si un producto es seguro y confiable, ya que hay microorganismos que aunque no sean patógenos pueden afectar la estabilidad de los medicamentos y/o indicar un manejo sanitario deficiente del mismo.
- 5.- Generalmente un análisis microbiológico tarda entre 2 a 7 días, y que en ocasiones, estas pruebas se pasan por alto, debido a la necesidad de liberar el producto para su venta, es importante enfatizar que es necesario tener procedimientos estandarizados de análisis para que los parámetros a evaluar dependan solo de las características del fármaco como tal y de su proceso de fabricación y no del manejo de la muestra que le da el microbiólogo.
- 6.- En general la principal norma que debe tener un laboratorio de microbiología es la de evaluar las áreas productivas, y sistemas críticos como el agua y aire, y contar con límites de alerta para estos procesos para evitar la contaminación de los productos, ya que de esta manera se evitan riesgos innecesarios a la economía de la empresa.

GLOSARIO DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

SIMBOLOS

B ₁₂	Cianocobalamina
pH	Potencial de hidrógeno
mL	Mililitros
°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
%	Porcentaje
H ₂ S	Acido sulfihidrico
g	Gramo

ABREVIATURAS

AST	Agar Soya Trypticaseína
ATCC	Número de control de clasificación taxonómica
API	Identificación de microorganismos puros aislados
Etc.	Etcétera.
AST	Agar Soya Trypticaseína
C	Caldo
EDTA	Etilen diamino tetra acético
EMB	Eosina azul de metileno
Etc.	Etcétera
F	Agar Flo
FDA	Food and Drug administrations
g	Gramo
hrs	horas
Kit	Estuche
McC	Agar Mac Conkey
No.	Número
NOM	Norma
P	Agar tech
Reg.	Reguladora
SS	<i>Agar Salmonella Shigella</i>
SSA	Secretaria de Salud
SM	Agar Sal y Manitol
TSA	Agar soya tripticaseína
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
UV	Ultravioleta
ULD	Xilosa Lisina desoxicolato

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FEUM 7ª Edición 1998 pp 189- 196, 335 – 341
- 2.- Norma IMSS JCC 01/ M.5.733.(Ago. 1998)
- 3.- United States Pharmacopelial Convention, INC.
USP 24 NF 19 2000. pp 1809 – 1824
- 4.- Guía para Inspección de Sistemas de Agua de Alta Pureza.(Julio 1998)
- 5.- Manual de Medios de Cultivo Merck 1999
- 6.- Manual de Medios de Cultivo Bioxón 1998
- 7.- Guías Para el Control Microbiológico de medicamentos.
(Comisión Interinstitucional de Prácticas adecuadas de Manufactura)
Monografía Técnica No 4 1998 pp 52 – 61
- 8.- Guía de Buenas Prácticas de Manufactura
DeVecchi Ingenieros 1998
- 9.- Guía de Procedimientos Adecuados del Laboratorio
Monografía Técnica
1ª Edición Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas.
- 10.- Buenas Prácticas de Fabricación, Auditorias técnicas en la industria
Farmacéutica. 1ª Edición. 1997
- 11.- Guía de Procedimientos Adecuados de Laboratorio Analítico.
Monografía técnica No 2 de CIPAM

BIBLIOGRAFIA

- 12.- Code of Federal Regulations. Food and Drugs.
CFR 4ª Ed. 1992
- 13.- Pruebas para la Identificación de Microorganismos
K. Muller 3ª Ed. 1999 Edit Grijalvo. Pp 23 – 72
- 14.- Pruebas Bioquímicas para La Identificación de Bacterias de Importancia
Clínica.
Jean F. Mac Faddin, 2ª Ed . Editorial Médica Panamericana
- 15.- Andrade E (1996) Influencia de la Glicerina en las Bacterias . J. Med Res 14,
551
- 16.- Bailey R. W. And Scott E.G. Diagnostic Microbiology, 2ª Ed St. Luis c. V.
Mosby Company 1996 pp 298 – 312
- 17.- BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, 5th Ed Cockeysville, Md:
Division of BioQuest, Division of de Becton, Dickinson and Company 1998
pp 131 – 152.
- 18.- Desing of a Comprehensive Environmental Control Program
F. DeVecchi Ene 2000
PDA
- 19.- Manual de Microbiología
Ernest Jawetz, 1981 pag, 333
- 20.- Norma NOM- 059 SSA-1
- 21.- Norma NOM – 123 SSA-1
- 22.- Guía de Validación de Medios de Cultivo
Comité Nacional de validación, México 1998