



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

AUDITORIAS DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN LA
INDUSTRIA FARMACEUTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

GUADALUPE TAPIA ZARAZUA

ASESOR: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA



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**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

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 TESIS:

Auditorias de Calidad Microbiológica en la

Industria Farmacéutica

que presenta la pasante: Guadalupe Tapia Zarazúa
con número de cuenta: 9361363-7 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.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de Septiembre de 2005.

PRESIDENTE	<u>Dr^a. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
VOCAL	<u>QFB Héctor Coss Garduño</u>	
SECRETARIO	<u>QFB Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB Olimpia Roxana Ponce Crippa</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC Nathaniel Soto Guevara</u>	

AGRADECIMIENTOS

Señor Jesús, te doy gracias por todo lo bueno que me has dado, por haberme creado y conservado la vida hasta estos momentos, por darme la oportunidad de concluir esta etapa que es tan importante para mi desarrollo personal y profesional.

A la persona más importante que me apoyo para poder desarrollar este proyecto, a quien admiro, amo y agradezco todo lo bueno que ha hecho por mí; mi esposo Adrián Águila Rocha.

A mis hijos, Vicente y Saúl que fueron la motivación para concluir esta etapa tan importante; ya que todos los beneficios que se obtengan serán siempre de ustedes y para ustedes. Los quiero mucho.

INDICE

OBJETIVOS	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPITULO I LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	8
1.1 LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	9
1.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS	16
1.3 REACTIVOS	33
1.4 MATERIAL BIOLÓGICO	38
1.5 PRINCIPALES TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	41
1.5.1 PROCEDIMIENTO DE LÍMITE MICROBIANO	41
1.5.2 PROCEDIMIENTO DE CONTROL AMBIENTAL DE AREAS LIMPIAS	50
1.5.3 PRUEBA DE ESTERILIDAD	53
1.5.4 RECEPCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS	58
1.5.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS POR EL METODO API	62
1.5.6 PROCEDIMIENTO DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO LAL	76
1.5.7 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE SEGURIDAD	81
1.5.8 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE PIRÓGENOS	83
1.5.9 PROCECIMIENTO DE LA EVALUACIÓN A SANITIZANTES	87
1.5.10 VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA	92
1.6 PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN	95
CAPITULO II AUDITORIAS	101
2.1 TIPOS DE AUDITORIAS	102
2.2 VERIFICACIONES	104
2.3 PROFUNDIDAD Y ALCANCE DE LA AUDITORIA	105
2.4 BENEFICIOS DE LAS AUDITORIAS	105

2.5	ELEMENTOS USADOS EN UNA AUDITORIA	106
2.6	ETAPAS DE UNA AUDITORIA	110
2.7	FUNCIÓN DE LA CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA	115
2.8	DEPARTAMENTO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO	115
CONCLUSIONES		129
ANEXOS		131
ABREVIATURAS		138
REFERENCIAS REVISADAS		141

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Establecer los lineamientos necesarios que permitan la implementación de auditorías internas en el departamento de Control Microbiológico.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Conocer el equipo necesario con el que debe contar un laboratorio de microbiología y su distribución.
2. Conocer las principales metodologías que debe tener el laboratorio según la FEUM y USP.
3. Elaborar el sistema documental correspondiente al departamento de Control Microbiológico que sirva como base y sustento para el desarrollo de auditorías.
4. Aplicar los PNO'S elaborados a las actividades realizadas en el departamento de control microbiológico.
5. Dar a conocer los documentos necesarios para llevar a cabo una auditoría interna, así como cada una de las etapas de que consta.
6. Guiar al auditado en la corrección de tallas encontradas durante la auditoría, para que cuando se presente una auditoría externa se encuentre sin no conformidades.

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Dentro de la industria farmacéutica, la calidad de los productos es un principio fundamental el cual se va construyendo desde el proceso de manufactura hasta la evaluación del mismo asegurando así que el medicamento siempre va a cumplir las mismas características y funciones con las que se diseñó originalmente. Para esto, la industria ha recurrido a implementar la tecnología en los procesos de operación, de evaluación.

Pero no sólo se requiere a la tecnología para asegurar la buena calidad de los productos, si no también existen ciertas normas que se deben cumplir, las cuales nos van a orientar para desarrollar procesos adecuados así como métodos para su buen control, éstas normas son nacionales e internacionales como son: la NOM -059-SSA1 BUENAS PRACTICAS DE FABRICACIÓN PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO-FARMACÉUTICA, 1995, NOM-060-SSA1 REGULACIÓN SANITARIA PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO-FARACÈUTICA, 1995, LA Guía de Prácticas Adecuadas de Manufactura Farmacéutica, que están en concordancia con la norma ISO 9000 o con las elaboradas en los Estados Unidos por la agencia de salud: Federal Drugs Administration (FDA por sus siglas en inglés), por medio del Código Federal de Regulaciones (CFR), ISO 9002, Cursos de Sistema de Calidad.

La Industria Farmacéutica cuenta con una área encargada de evaluar la calidad de los productos: El departamento de Control de Calidad aclarando que no es el encargado de dar la calidad a los productos, existe otros departamentos dentro de la industria que aunados con el mencionado anteriormente garantizan dicha evaluación.

Las áreas que constituyen al departamento de Control de Calidad son: inspección ó de proceso, Físicoquímico, Validación y Estabilidad y Control Microbiológico.

El presente trabajo pretende explicar lo referente al área de control Microbiológico considerando lo siguiente:

En el capítulo I "El laboratorio de Microbiología"

- a) Explicar como se constituye un laboratorio de Microbiología en la Industria que permita trabajar adecuadamente cumpliendo las buenas prácticas de Laboratorio.
- b) El equipo mínimo necesario con el que debe contar así como las condiciones que deben cumplir para garantizar la confiabilidad de los resultados.
- c) Los reactivos empleados en el laboratorio ya que son fundamentales para dar buenos resultados, considerando que trabajamos con microorganismos.
- d) El material biológico que es importante para enfocar la sensibilidad de los organismos vivos hacia los medicamentos.
- e) Conocer como englobamos todo esto mediante registros en bitácoras ó formatos que muestren la evidencia documentada para la trazabilidad de cualquier proceso, así como el seguir lo indicado en procedimientos normalizados de operación los cuales cumplen con los requisitos normativos indicados en la ley para garantizar la calidad.
- f) El conocimiento de algunas técnicas microbiológicas empleadas en la industria, nos ayudarán a conocer la forma de trabajar de manera apropiada como se indica en la FEUM, FDA etc.

En el capítulo II

Lo antes planteado es necesario conocerlo para cuando se desea aplicar un sistema de calidad, mediante un programa de auditorias que demuestren el cumplimiento y la conformidad de los requisitos normativos que identifique las deficiencias en el cumplimiento de éstos.

Para poder llevar a cabo una auditoria se debe conocer y entender el concepto así como tipo de auditoria y saberla aplicar. Entendiendo como auditoria a un examen sistemático e independiente para determinar si las actividades de la calidad y sus resultados satisfacen los requisitos preestablecidos y si los mismos son instrumentos efectivamente.

Es necesario dichas auditorias al área de Control de Calidad en este caso a Control Microbiológico como una forma de calificar la forma de trabajar adecuada que garantice realmente que los productos farmacéuticos evaluados microbiologicamente no contienen contaminación microbiana.

CAPITULO I

“LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA”

1. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

1.1 INSTALACIONES

Las instalaciones comprenden las áreas de trabajo y todos los servicios auxiliares necesarios para el funcionamiento de las mismas.

Cualquiera que sea la distribución, se tendrá siempre en un área común de servicios administrativos.

Las instalaciones de las diferentes áreas de trabajo estarán integradas por los siguientes renglones:

- Características arquitectónicas
- Equipos auxiliares
- Servicios auxiliares
- Mobiliario
- Zonas de lavado
- Zonas de almacenamiento
- Área de Servicios Administrativos

1.1.1 CARACTERÍSTICAS ARQUITECTONICAS

A) SUPERFICIE. La superficie de cada área será tal que permita la instalación de los equipos e instrumentos fijos que se requieran, dejando un espacio suficiente entre uno y otro a fin de que el personal trabaje cómodamente y se puedan llevar a cabo con facilidad los servicios de limpieza y mantenimiento necesarios.

Así mismo, se deberá contar con áreas de tránsito que permitan el libre paso de equipo, personal y la intercomunicación entre las áreas que así lo requieran (por ejemplo, entre la de Límite microbiano y la de Resiembras).

B) VENTILACIÓN. Las áreas deberán estar bien ventiladas, mediante accesos de aire colocados estratégicamente. Si el caso lo requiere, deberán ser dotadas de ventilación forzada y cuando sea necesario con aire acondicionado, con humedad relativa y temperatura controladas, deberán evitar las corrientes de aire.

C) ILUMINACIÓN. Las áreas de trabajo tendrán iluminación adecuada para el correcto desempeño del trabajo. La iluminación natural será complementada con un sistema de alumbrado artificial que permita al personal trabajar cómodamente.

D) **ACABADOS.** En todas las áreas se preferirán terminados lisos sin interrupción de continuidad para paredes, techos y pisos. Las uniones de los techos-paredes, pisos-paredes, paredes y paredes, serán redondeadas, de acabado sanitario para evitar acumulaciones de materiales o polvo y mantener las condiciones de higiene y seguridad necesarias.

Se tiene que tomar en cuenta la sanitización una condición indispensable de trabajo, los acabados deberán ser de materiales que puedan resistir la acción de los sanitizantes que se utilicen.

1.1.2 EQUIPOS AUXILIARES

En el área de microbiología se recomienda tener cuartos limpios ó zonas aisladas en donde se instalen las campanas de flujo laminar, campanas de seguridad biológica, etc.

Se tendrá zonas para autoclaves, estufas de cultivo, hornos de esterilización, etc.

En la zona delimitada para la instalación de las autoclaves habrá medios adecuados de extracción para evitar la acumulación de calor.

Sí las autoclaves no generan su propio vapor podrán alimentarse con vapor de una central térmica. En todos los casos las instalaciones deberán cumplir con los reglamentos oficiales vigentes.

1.1.3 SERVICIOS AUXILIARES

- A) **ENERGIA ELECTRICA:** Deberá contar con un suministro de energía eléctrica suficiente para el correcto funcionamiento de los equipos e instrumentos en ella instalados.
- B) **AGUA Y DRENAJE:** Se tendrán líneas de agua (de preferencia fría y caliente) y drenaje. Este último deberá estar protegido con céspeles que mantengan la hermeticidad entre el drenaje y los cuartos de trabajo. Además se evitará en lo posible tener llaves para agua dentro de los cuartos de trabajo de Microbiología.
- C) **GAS COMBUSTIBLE, OXIGENO Y NITROGENO:** Los depósitos de gas, que sean tanques móviles o estacionarios, se colocarán alejados de las áreas de trabajo y las tuberías de gas se instalarán siempre sin empotrar en las paredes.
- D) **OXIGENO, VACIO Y AIRE COMPRIMIDO:** Estos servicios auxiliares podrán ser suministrados por equipos pequeños de laboratorio (como bombas de vacío, compresores pequeños, etc.), o bien por instalaciones centrales.

E) **IDENTIFICACIÓN DE LAS LÍNEAS DE SERVICIOS.** Se recomienda identificar las líneas de los servicios auxiliares utilizando al efecto el Código de Colores publicado por la Asociación farmacéutica Mexicana, A.C.

1.1.4 ZONAS DE LAVADO

Siendo el lavado del material de laboratorio una de las operaciones más críticas para la obtención de resultados analíticos correctos, se han considerado necesario trazar las zonas de lavado como separadas de las demás zonas de trabajo.

La zona de lavado deberá contar con una zona de recepción de material sucio que estará dividida en zona de recepción de material contaminado antes de que esta pare a la zona de recepción de material sucio.

En el área donde se lleva a cabo el lavado del material se contará con tarjas de acero inoxidable dotadas preferentemente de agua fría y caliente. Además deberá contarse con un servicio accesible de agua purificada para los enjuagues finales. Respecto al drenaje, se deberán seguir las disposiciones oficiales vigentes en referencia al equilibrio ecológico.

Zona de Almacenamiento de Material limpio: el material que estará en contacto con el desarrollo o inhibición de microorganismos deberá esterilizarse antes de su uso. Al efecto, para la esterilización por calor húmedo podrán utilizarse la misma zona y equipo empleados para esterilizar el material sucio antes de que éste sea lavado. Se empleará horno cuando se indique por calor seco.

1.1.5 ZONAS DE ALMACENAMIENTO

Estas pueden dividirse en:

- ❖ Zona de almacenamiento de material
- ❖ Zona de almacenamiento de reactivos
- ❖ Zona de almacenamiento de instrumentos.

- ❖ ZONA DE ALMACENAMIENTO DE MATERIAL. Pueden consistir en estantes individuales, hasta cuartos separados.

- ❖ ZONA DE ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS. Podrá estar formada por estantes individuales o bien por cuartos separados.

- ❖ ZONA DE ALMACENAMIENTO DE INSTRUMENTOS. Las zonas de almacenamiento de instrumentos deben reunir condiciones ambientales que las preserven del polvo, humedad y la temperatura excesivas. Podrán estar constituidas por gavetas, o bien estantes según las necesidades del laboratorio.

1.1.6 AREA DE SERVICIOS ADMINISTRATIVOS.

Esta área puede comprender la siguiente lista de secciones que a continuación se enumeran en forma indicativa, pero no exhaustiva.

1. SECCION DE RECEPCIÓN Y REGISTRO DE MUESTRAS.
2. SECCIÓN DE ENTREGA DE RESULTADOS DE MUESTRAS.
3. BIBLIOTECA
4. ARCHIVO GENERAL TÉCNICO
5. ARCHIVO DE DOCUMENTACIÓN OFICIAL

1.1.7 ÁREA LIMPIA DE MICROBIOLOGÍA

Esta área puede comprender, aquella donde se realiza: lectura de placas, valoraciones microbiológicas, reto a sanitizantes, resiembras, etc.

1.1.8 ÁREA ASÉPTICA DE MICROBIOLOGÍA

Esta área es indispensable, cuando el laboratorio farmacéutico produce fármacos parenterales. Esta debe tener como mínimo: desvestidor, vestidor, esclusa, esclusa de luz. U.V., Campana de flujo laminar para realizar los análisis, debe contar con una esclusa que conecte al autoclave para uniformes y material empleado en ésta. Contar con filtros HEPA y un sistema de inyección y extracción de aire.

El área aséptica de Microbiología, se valida para asegurar un ambiente apropiado para el manejo de muestras que en ella se realizan, de acuerdo a las especificaciones establecidas por la empresa y a la normatividad mexicana vigente para las Buenas Prácticas de Fabricación. NOM- 059:SSA1-1993[6], a la GUÍA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA PARA CUARTOS LIMPIOS 1989, MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CLEANROOMS AND OTHER CONTROLLED ENVIRONMENTS 1995, el cual es desarrollado en la USP.

Descripción de la Validación

La validación de las condiciones aerodinámicas del Sistema de Aire controlado HVAC que da servicio al área aséptica consiste en medir la temperatura y humedad relativa de cada uno de los cuartos del área a evaluar y ajustar la velocidad de flujo del aire a la salida de los filtros HEPA instalados en el área, se realiza la prueba de conteo de partículas a nivel de cada filtro, prueba de integridad que consiste en generar un aerosol del cual se conoce su tamaño de partícula, hacerlo pasar por el filtro HEPA mediante el propio flujo del sistema y con un fotómetro de capacidad conocida realizar la lectura (EMERY 3004) y la eficiencia de los filtros HEPA, además se verifica la laminaridad del flujo de aire de cada uno de los filtros HEPA. Así como la medición de las presiones diferenciales, los sentidos de flujo de aire entre cuartos y área y la clasificación de la calidad del aire en cuartos limpios, con relación a las partículas aerotransportadoras.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN.

- a) Los filtros terminales HEPA deberán ser de sello de gel y de las dimensiones y especificaciones según hoja técnica y memoria de cálculo del área y deberán contar con su certificado de eficiencia de 99.97 a 99.99% en retención de partículas de 0.3 micras prueba de EMERY 3004 según sea el caso.

Los filtros visualmente no deben presentar daños o maltratos que afecten su evaluación posterior. La superficie del filtro que puede estar sellada o de ser mayor del 3% del total del área del mismo (filtro nuevo), el filtro debe estar bien nivelado con respecto a la superficie del plafón y el pleno no debe mostrar raspaduras.

- b) La velocidad del aire en los filtros en condiciones estándar de operación será medida con un anemómetro calibrado. Se realizarán mediciones en 5 puntos con 5 lecturas cada puntual para filtros de 24 x 24 in a una distancia de 2.5 in de la cara del filtro. Las lecturas deberán estar dentro de los siguientes límites: 0.40 – 0.50 m/s ó 78.7 – 98.4 ft/min. Teniendo un rango de uniformidad de velocidades máxima permisible de $\pm 15\%$.

- c) La cuenta de partículas en filtros HEPA, por pie cúbico deberá cumplir con base a los siguientes requerimientos:

- i) En filtros absolutos menos de 100 partículas de 0.5 micrones con un intervalo de confianza de 95%. El tiempo de lectura para filtros será de un minuto en el marco

interior, tres minutos en el pleno, a una distancia entre el sensor y el pleno del filtro de 3 in.

- ii) En la prueba de eficiencia e integridad de filtros la penetración máxima aceptable es de 0.03% para filtros de 99.97% de eficiencia y 0.01% para filtros de 99.99% de eficiencia. En caso de requerirse, para cumplir con esta condición, los filtros serán sellados; el sello no deberá cubrir un área mayor al 3% de la superficie filtrante en el caso de filtros nuevos y 5% para filtros en uso. El fotómetro será utilizado para realizar la prueba de integridad y eficiencia de filtros HEPA, la cual se realiza a través del puerto de aguas arriba. La distancia entre el sensor y el pleno del filtro de 1 in.
- iii) El perfil de flujo de aire se hará con una pequeña muestra de tetracloruro de titanio con un aplicador tipo hisopo, puesto que en el centro del filtro para verificar que el flujo de aire a la altura de la zona de trabajo sea laminar sin turbulencias y que no haya flujo de aire en retroceso, también se debe utilizar una pantalla negra para que el humo desprendido sea perceptible y se pueda sacar fotografía como evidencia.

EVALUACIÓN DE LOS CUARTOS DEL AREA ASEPTICA DE MICROBIOLOGÍA

Se verificará los siguientes parámetros:

- a) La temperatura del área deberá ser de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa deberá estar dentro del rango del 20 al 60%.

La temperatura y la humedad relativa podrán ser mayores o menores cuando las características del producto o del proceso lo requiera.

- b) Se verificará que los puertos de presión de cada cuarto estén conectados a un manómetro de presión diferencial y que diferencial de presión entre cuartos este de acuerdo a lo especificado en la impresa y a la normatividad mexicana. La medición de la presión diferencial entre cuartos adyacentes se realizara con el manómetro calibrado.

* La diferencial de presión entre un área limpia y un área con aire no controlado no deberá ser menor de 0.05 in H_2O .

* La diferencial de presión entre dos áreas limpias deberá ser no menor de 0.02 in H_2O con respecto al área con mayor requerimiento de limpieza.

En caso de que las presiones no cumplan se procederá a verificar las velocidades de los difusores y a balancear el área con las rejillas de extracción. Se verificará que los manómetros de presión diferencial del área estén calibrados e identificados.

El sentido de flujo de aire se verificará con un vaneómetro.

Verificación de la calidad del aire del cuarto en base al conteo de partículas en la zona de trabajo en condiciones estáticas. El número mínimo de localizaciones a muestrear será igual a la raíz cuadrada del área del piso de la zona limpia, espaciadas uniformemente en dirección horizontal, de acuerdo al ISO 14644-1:1999

El número de partículas medidas por pie cúbico, que definen la clase del área, se encuentra ilustrada en la tabla:

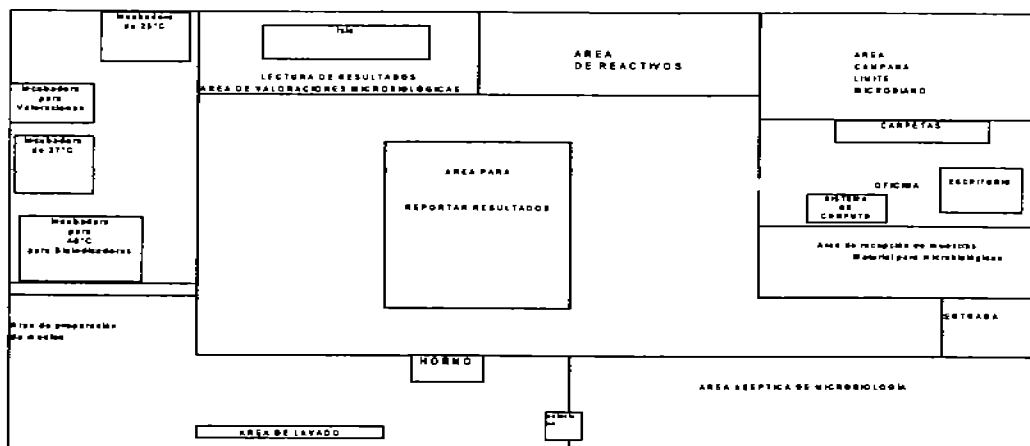
TABLA DE CLASIFICACIÓN DE AREAS

Número Clasificación ISO	Límite máximo de concentración de partículas (partículas/m ³ de aire)					
	0.1 µm	0.2 µm	0.3 µm	0.5 µm	1 µm	5 µm
ISO CLASE 1	10	2				
ISO CLASE 2	100	24	10	4		
ISO CLASE 3	1 000	237	102	35	8	
ISO CLASE 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
ISO CLASE 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
ISO CLASE 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
ISO CLASE 7				352 000	83 200	2 930
ISO CLASE 8				3 520 000	832 000	29 300
ISO CLASE 9				35 200 000	8 320 000	293 000

Para cumplir con la clasificación de limpieza definida, las partículas encontradas en los muestreos deberán cubrir el límite indicado en un intervalo de confianza del 95%.

El registro del número de partículas será el que emite el contador de partículas.

PLANO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



1.2 EQUIPO E INSTRUMENTOS

El laboratorio debe contar con los equipos e instrumentos adecuados a sus necesidades y recursos, por lo que no se intentará hacer una enumeración y descripción de todos, sino de los que considero importantes para el área de microbiología.

EQUIPO. Se considera como equipos todos aquellos aparatos que son necesarios para llevar a cabo los procesos analíticos, pero que no proporcionan resultados cuantitativos para los mismos, como son las autoclaves, los hornos, las estufas, las campanas de extracción de gases, las campanas de flujo laminar, las bombas de vacío, etc.

INSTRUMENTOS. Se consideran instrumentos todos aquellos aparatos que se utilizan en los diferentes métodos analíticos y que proporcionan resultados cuantitativos (medibles), como por ejemplo los espectrofotómetros, los potenciómetros, los acuómetros, etc.

1.2.1 INSTALACIÓN.

Áreas: Los equipos e instrumentos se instalarán en zonas delimitadas que los separen del resto del laboratorio. Los instrumentos en particular, no se instalarán en áreas donde puedan estar sujetos a la acción de reactivos, de la humedad, de la alta temperatura, y en general de todo aquello que pueda afectar su funcionamiento y conservación.

Servicios: Las áreas donde se instalen los equipos e instrumentos deberán contar con los servicios auxiliares necesarios (agua, energía eléctrica y ventilación). Además, ocasionalmente podrá requerirse mantener la temperatura y humedad dentro de límites establecidos.

Mobiliario: El mobiliario que soporte los equipos e instrumentos deberá ser diseñado e instalado en forma tal que prevenga todo aquello que pueda afectar el correcto funcionamiento, limpieza y mantenimiento de los mismos, considerándose para ello, factores tales como el espacio, entre equipos e instrumentos, la nivelación, las vibraciones, etc.

Seguridad: Cuando sea necesario, los equipos e instrumentos contarán con dispositivos de seguridad que protejan tanto al personal como al equipo mismo (por ejemplo, conexiones eléctrica a tierra).

1.2.2 REGISTRO Y DOCUMENTACIÓN DE EQUIPO E INSTRUMENTOS

Información General. Se conservará un registro de cada aparato en la que figuren:

- a) Nombre y marca del equipo
- b) Descripción resumida
- c) Modelo, serie y fecha de adquisición
- d) Número de inventario
- e) Nombre del fabricante o representante
- f) Compañía que proporciona servicio

Manuales. A la información general enumerada en el inciso anterior se adjuntarán los manuales que proporciona el fabricante que deben comprender:

- a) Instructivo de instalación

- b) Instructivo de operación
- c) Instructivo de reparaciones de urgencia que puedan ser efectuadas por personal no especializado
- d) Instructivo de mantenimiento
- e) Instructivo de calibración o verificación de parámetros.
- f) Lista de accesorios de repuesto sugeridos.

Registro de control de uso ó desgaste: Junto a cada aparato habrá un registro en donde se anotarán los siguientes datos:

- a) Fecha de utilización
- b) Tiempo analizado
- c) Analista y referencia de análisis
- d) Muestra analizada
- e) Reporte de anomalías si las hubiera

Registro de Mantenimiento y control de fallas.

Para cada equipo e instrumento se llevará un registro completo de los mantenimientos efectuados ya sean correctivos o preventivos. Estos últimos se sujetarán a un programa establecido de acuerdo a las sugerencias del fabricante o bien por la experiencia del jefe del laboratorio.

Cuando se trate de mantenimientos correctivos, se anotarán las fallas detectadas, las medidas tomadas para corregirlas y si el servicio fue efectuado por una persona del laboratorio o por técnicos especializados.

Para facilitar el mantenimiento se conservará al día el inventario de material de repuesto. Este último deberá reponerse tan pronto como sea posible.

1.2.3 CALIBRACIÓN Y VERIFICACIÓN.

Todos los instrumentos se someterán a una revisión periódica de calibración y mantenimiento para verificar su exactitud, sensibilidad y reproducibilidad.

Los equipos se someterán a un servicio periódico de mantenimiento y si es necesario de calibración, a fin de certificar que cumplen con los parámetros fijados en su diseño.

1.2.4 BALANZAS

CONCEPTO: Instrumento empleado para la medición de masa.

TIPOS:

- Balanza de precisión



- Balanza granataria



- Balanza automática



Pruebas para la calibración de una balanza (Metrología de las balanzas).

Excentricidad: Consiste en colocar una pesa en diferentes posiciones sobre el dispositivo receptor del plato, se comprueba con una carga equivalente al 30% de la carga máxima de la balanza.

Repetibilidad: se conoce como comprobación de fidelidad. No es más que la aptitud del instrumento que para un mismo valor de carga colocado varias veces (20 veces) y de forma origine lecturas semejantes. Esta comprobación se realiza con pesas al 50% y 100% del alcance máximo de la balanza.

Linealidad: es la más importante de las pruebas porque se determinan los errores de indicación. Se carga al equipo desde un valor mínimo hasta el máximo y viceversa. Entre cada prueba existe un tiempo de estabilización.

Operación y cuidados.

Tomaremos en cuenta la operación de la balanza más empleada en el laboratorio de microbiología que es la automática.

Operación.

1. Encender la balanza. El instrumento realiza un test automático
2. Colocar el recipiente para la muestra
3. Tarar la balanza
4. Poner muestra en el recipiente y automáticamente proporciona el peso de la muestra.

Cuidados

1. Antes de operar la balanza, verifique es ésta se encuentre con la burbuja de nivelación centrada.

La nivelación se realiza sólo con ambas patas de regulación delanteras

2. Limpieza: Retirar y limpiar el platillo de pesada con un paño suave al igual que el resto de la balanza. No utilizar detergentes agresivos y no permitir que se infiltren líquidos en la balanza.

1.2.5 AUTOCLAVE

Es aquel equipo que utiliza una presión superior a la presión atmosférica para lograr modificaciones químicas ó físicas de la materia.

La esterilización por vapor es un proceso probado para exterminar microorganismos. El calor alcanzado daña las estructuras esenciales de la materia orgánica incluyendo la membrana citoplasmática. Consiste en la variación dentro del tanque de los valores de presión, vacío y

temperatura que conjuntamente con el procedimiento de deshidratación de su contenido, elimina las células bacterianas.

TIPOS:



Olla de presión



Autoclave Eléctrica



Autoclave de doble
cámara horizontal

La más ampliada en el laboratorio de microbiología es la autoclave de doble cámara horizontal

El método más efectivo de esterilización es la aplicación de calor húmedo o seco. El vapor a 121 °C (250 °F) bajo presión en el autoclave es el método más conveniente para esterilizar rápida y eficazmente. Para lograr la esterilidad no es suficiente con alcanzar dicha temperatura en la máquina, ya que depende del tipo de materiales que se colocan en el autoclave, como insumos de laboratorio, reactivos, tipo de desechos, etc.

Las autoclaves deben controlarse para asegurar que los métodos utilizados logren la esterilización de los materiales. Existen métodos de control químicos y biológicos. Se utilizan diariamente los químicos como control de rutina, aunque no son considerados una prueba definitiva.

Controlar un autoclave con un indicador biológico es el método de prueba más aceptado actualmente. Se realiza con esporas, comúnmente con el bacilo *Steartothermophilus*, que puede sobrevivir hasta 13 minutos a una temperatura de 121 °C (250 °F). Estos microorganismos son los más resistentes a la temperatura y así proveen un margen adecuado de seguridad cuando validan los procedimientos de esterilización.

Los materiales a desinfectar deberán llevarse al autoclave en recipientes sellados y a prueba de fuga.

a) Recipientes recomendados para autoclave

- * Recipientes de polipropileno de 5 y 12 galones (alto) y recipientes de esterilización (poco profundos).
- * Recipientes o cubos de metal de acero inoxidable
- * Bolsas de polipropileno (especiales para desechos biopeligrosos y para autoclaves).
- * Recipientes de vidrio (frascos, botellas).
- * Contenedores de cartón gruesos encerados.

Metal (acero inoxidable)

El acero inoxidable es un buen conductor de calor, por lo que no requiere aumentar el tiempo de esterilización. Cuando el tiempo disponible para la esterilización en autoclave es limitado, los recipientes de metal son la mejor elección, aunque su alto costo puede tornarlos inaccesibles para muchas Instalaciones de Salud.

Polipropileno

El polipropileno es una resina de bajo costo capaz de resistir las temperaturas de autoclave. Los contenedores de polipropileno están disponibles en una variedad de aspectos y formas, incluyendo recipientes y bolsas. Las bolsas deben abrirse para permitir que el vapor penetre; deberá ponerse agua en el fondo para facilitar el traslado de calor a los desechos que son esterilizados.

Vidrio

Los instrumentos de vidrio enviados al autoclave para su esterilización deben ser de vidrio refractario del tipo Pyrex. Como el vidrio puede romperse por el cambio brusco de temperatura, se recomienda entreabrir la puerta del autoclave para permitir que el calor escape y esperar que el material se enfríe aproximadamente 10 minutos antes de su remoción.

b) Sugerencias operativas

Es imposible dar tiempos fijos para la esterilización en autoclave debido a la variabilidad de condiciones. Sin embargo, hay dos recomendaciones de gran utilidad:

Probar procedimientos para la autoclave con un indicador biológico. Esto debería repetirse a intervalos regulares. El autoclave debe controlarse de la manera siguiente:

- * Verificación biológica: Semanal, usando un sistema confiable de verificación con esporas.

- Verificación mecánica: Cada operación deberá controlarse con relación a su temperatura, tiempo y presión.
- Control químico: Utilizar monitores químicos cada vez que es puesta en funcionamiento.

Tener en autoclave los materiales de desecho por lo menos 30 minutos, contados a partir del momento en que la máquina haya alcanzado la temperatura requerida. Si la carga es grande, puede demorar 30 minutos como mínimo en alcanzar los 121°C.

La temperatura y el tiempo de permanencia variarán en relación al volumen de material, contenido de humedad y otros factores.

Realizar constantemente un chequeo del nivel de agua, de la válvula de seguridad.

A continuación se brindan directivas de tiempo de esterilización en autoclave para diferentes tipos de carga:

- Recipientes / vasijas con bolsas de polipropileno medianamente llenas: mínimo 30 minutos.
- Recipientes / vasijas con bolsas de propileno completamente llenas y cerradas: más de 60 minutos.
- Recipientes (altos) en polipropileno de 6 y 12 galones, sin tapas, bolsa abierta y llena: más de 90 minutos.
- Cubos de metal con bolsas libremente reunidas, llenos, sin tapa: 30 minutos.
- Cubos de metal con tapa: 45 minutos.

Es importante destacar que los tiempos sugeridos son una indicación aproximada para lograr la esterilización, pero no deben considerarse definitivos. Para comprobar la eficacia de la esterilización, es conveniente recurrir a los indicadores biológicos, como se recomendó anteriormente así como a la validación del proceso de esterilización.

Para validar un proceso de esterilización es necesario seguir con los puntos a calificar como lo indica la FDA, IQ (Calificación de instalación), el OQ (Calificación de Operación) y por último PQ, calificación de desempeño.

La calificación de instalación, esta diseñada para comparar el sistema en relación con las especificaciones del fabricante, por tanto se debe contar ó tomar en cuenta lo siguiente:

- Diagramas de todos los servicios que abastecen el esterilizador para confirmar que todas las conexiones cumplen con lo especificado, y con los límites de diseño.

- La documentación: modelo, número de serie, número de identificación por departamento, procedimientos, mantenimiento preventivo, procedimientos de sanitización, calibración, modificaciones hechas,
- Verificación de dimensiones
- Sistema eléctrico
- Sistema de ventilación del área donde se ubica el equipo
- Los empaques de las puertas
- Instrumentos: Identificar todos los dispositivos, controladores y registradores, tanto críticos como no críticos para la operación de la unidad, esto puede incluir: para temperatura, tiempo, presión, flujo de aire e indicadores de luz.

La calificación de Operación. Una vez que el equipo ha sido verificado para una instalación apropiada por medio de la calificación de instalación, es necesario determinar si el esterilizador se desempeña de acuerdo a diseño. Los componentes del sistema deben satisfacer el rango de operación, como lo determinan las especificaciones establecidas por el usuario del equipo.

El esterilizador debe ser operado para confirmar que funciona correctamente de manera repetida.

El documento de Calificación de Operación debe ser revisado y firmado por los representantes de los departamentos requeridos.

Los puntos a evaluar en la operación son:

- Monitores de temperatura,
- Medidor de tiempo de ciclo
- Calentadores
- Serpentin de enfriamiento
- Bandas
- Fugas de la cámara

Por último, cumplido todo lo anterior, se realiza la calificación de desempeño, la cual consiste en hacer un ciclo de esterilización con cámara vacía colocando termopares en por lo menos 13 puntos del equipo.

Todo el equipo utilizado para la validación de equipos deben estar calibrados.

Estos termopares están conectados a un registrador multipunto, el cual va registrando los valores de temperatura de cada termopar a diferentes tiempos.

Establecidos los patrones de carga, se hacen diferentes corridas para asegurar la esterilización o despirogenización del material inclusive en los puntos más fríos y se establece así el tiempo de calentamiento del equipo, el tiempo del ciclo de esterilización para cada patrón de carga.

1.2.6 POTENCIÓMETRO

Como es sabido, el valor de pH de una solución acuosa, describe su acidez o alcalinidad. En iones H^+ tenga una solución, será más ácida.

Uno de los métodos para a medición del pH es el potenciométrico, éste utiliza el sistema del electrodo que consiste de un sensor cuyo funcionamiento es similar al de una batería:

- a. Tiene dos conexiones
- b. Su voltaje de salida varía con la temperatura
- c. Tiene un tiempo y uso de vida limitado
- d. Tienen un voltaje definido de salida; casi cualquier electrodo puede ser usado con casi cualquier peachimetro.

UN SISTEMA DE MEDICIÓN DE pH CONSISTE EN:

- a. Un electrodo de pH, su voltaje de salida varía con la variación de pH.
- b. Un electrodo de referencia, su voltaje permanece constante con la variación de pH.
- c. Un peachimetro, un medidor de milivolts, con un circuito especial de entrada de alta intensidad y circuitos que cambian la lectura de los milivoltios a unidades de pH.
- d. Opcionalmente un compensador de temperatura, un dispositivo que toma la lectura de temperatura para que el medidor pueda corregir los efectos del cambio de la misma.

CALIBRACIÓN DE UN POTENCIOMETRO.

Debido a las variaciones en la naturaleza y operación de los medidores de pH disponibles, no es práctico dar instrucciones universalmente aplicables para las determinaciones potenciométricas del pH.

Los principios generales dados a continuación se deben ajustar a las indicaciones provistas para cada aparato por su fabricante. Antes de su empleo, examinar los electrodos y verificar si esta presente el puente salino.

Para calibrar el medidor de pH seleccionar dos soluciones de calibración cuya diferencia de pH no exceda 4 unidades, de manera tal que el pH a determinar este comprendido entre ambos valores. Llenar un recipiente con una de las soluciones de calibración a la temperatura a la cual se medirá la solución muestra.

Fijar el control de temperatura a la temperatura de la solución a medir y ajustar el control de calibración de manera que el valor del pH observado sea idéntico al tabulado.

Lavar los electrodos y el recipiente. Medir de igual forma el pH de la segunda solución a la misma temperatura. El pH de la segunda solución de calibración debe estar entro de ± 0.07 unidades del valor de pH tabulado. Si se observa una desviación mayor, examinar los electrodos y reemplazarlos si presentan defectos.

Los electrodos son puestos en soluciones llamadas buffer de un pH conocido, normalmente utiliza 4.01, 7.00 y 10.00 pH. Normalmente se calibra al punto cero del sistema 7.00 debe contar con un botón o un potenciómetro de ajuste para que la lectura se ajuste a 7.00. Como segundo se enjuaga el electrodo y se sumerge en la segunda solución buffer, se calibra en solución 4.00 si la solución a medir es ácida, si es una alcalina se calibra a 10.00.



Foto: potenciómetro con las soluciones para calibración

OPERACIÓN.

1. Saque el electrodo de su botella de remojo y conserve la botella.
2. Agite el electrodo vigorosamente en una solución de enjuague.
3. Sacuda el electrodo con un movimiento brusco para remover las gotas de solución restante.
4. Agite el electrodo vigorosamente en la solución muestra y deje estabilizar.
5. Una vez estabilizado, tome la lectura.

PROBLEMAS COMUNES EN ELECTRODOS.

Existen de manera normal ciertos problemas con los electrodos, independientemente de que estos sean:

1. Envejecimiento: causado por lecturas de alto o bajo pH, altas temperaturas, solubilidad, etc.
2. Recubrimientos: las sustancias que se miden a veces dejan un recubrimiento sobre el electrodo.
3. Abrasiones: Cuando los electrodos de vidrio están rayados fallan en su funcionamiento.
4. Fragilidad del bulbo: el grosor del bulbo y como se encuentra protegido afecta la lectura.
5. Ataque químico: algunos químicos atacan al vidrio otros al plástico.

1.2.7 INCUBADORA.

Es aquel equipo empleado para proporcionar a los ensayos microbiológicos la temperatura óptima a la cual se desarrollarán los microorganismos.

Este tipo de equipos debe contar con un procedimiento de operación y de limpieza, con una bitácora de registros de la temperatura para detectar cualquier falla.

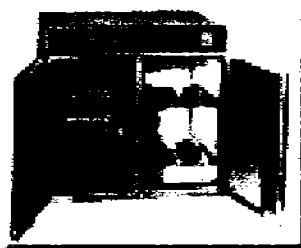


foto: incubadora lab-line empleada para crecimiento de mesófilos

VALIDACIÓN.

Calificación de Instalación. (IQ). Es propiamente de la instalación, y se hace referencia de las guías especificadas, al soporte eléctrico, la identificación del equipo, la documentación necesaria, el material de los componentes, Lubricantes, etc.

Equipo Identificado: Número de serie, modelo, nombre del fabricante, y localización del equipo, código interno empleado por el proveedor.

Documentación: el manual de operación y mantenimiento y diseño del equipo. Los procedimientos de operación y limpieza del equipo.

Requerimientos del equipo para su uso: Especifica el voltaje y amperajes requerido para sus buenas condiciones de operación.

Calificación de operación: (OQ) es una evaluación que podría establecer si el equipo puede operar conforme a especificaciones.

Se verifica a todos los instrumentos críticos en el equipo, evaluando el botón de encendido y apagado, los indicadores de temperatura, el menú del panel de control si es que cuenta con él, el botón de ↑ para aumentar la temperatura o el de ↓ para disminuirla, el sistema de alarma.

Una vez realizado esto, se realiza una corrida con cámara vacía colocando 16 termopares en diferentes puntos de la incubadora y se detectan los puntos más fríos por un lapso de 24 horas y se establece el rango de temperatura para trabajar el equipo. Los termopares empleados tienen que estar previamente calibrados.

Calificación de desempeño: (PQ) Se realiza la calificación de desempeño, de acuerdo las condiciones de rutina de operación del equipo, y haciendo la corrida con los termopares pero ahora con cámara llena, para esto se requiere el patrón de carga.

1.2.8 CAMPANA DE FLUJO LAMINAR

Las campanas de flujo laminar están diseñadas para proporcionar zonas estériles de trabajo, permitiendo un alto grado de libertad de operación que cumplen con el Federal Standard 209D US. Son ideales para realizar actividades que requieran condiciones de esterilidad en donde se manejen materiales que no contengan microorganismos patógenos para el personal que opera el equipo. Básicamente las condiciones de esterilidad se logran mediante dos procedimientos simultáneos: la introducción de aire estéril hacia la zona de trabajo y el confinamiento a velocidades bajas de dicho aire logrando que este avance en una sola dirección tomando la forma de los objetos que encuentra a su paso por la zona, evitando la contaminación exterior y aquella que podría provenir de los objetos localizados en la zona de trabajo.

El cuerpo de las campanas está construido en acero al carbón con acabados de esmalte electrostático. Al frente en la parte inferior de la campana se localiza la ventanilla de alimentación de aire que cuenta con un prefiltro de fibra sintética cuya función principal es la de detener las partículas grandes suspendidas en el medio ambiente del laboratorio. El aire prefiltrado de esta

manera pasa a la cámara de compresión de aire y es enviado mediante la acción de un soplador de aire hacia el filtro HEPA que lo envía hacia la zona de trabajo a una velocidad de 80 a 120 FPM.

OPERACIÓN.

- 1.- Limpiar y sanitizar la campana de flujo laminar, de las partes menos sucias hacia las más sucias, de adentro hacia fuera.
- 2.- Enciender el interruptor y dejar que fluya el aire por lo menos 30 minutos antes de ocupar el equipo.
- 3.- Sólo mantener las manos dentro del área de trabajo, no introducir el cuerpo.
- 4.- Al concluir las pruebas microbiológicas limpiar y sanitizar nuevamente el equipo y apagar el interruptor.

CALIFICACIÓN DE LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR.

PRUEBAS DE INTEGRIDAD DEL FILTRO

1. Prueba Biológica de esterilidad.

Forma parte de los protocolos de calidad. Es necesario realizarla después de que la campana ha sido instalada ya que será una herramienta muy útil para valorar los procedimientos de transporte e instalación de la misma.

- a) Preparar de 7 a 9 cajas Petri con AST.
- b) Seguir las instrucciones de operación.
- c) Distribuir de 6 a 8 cajas Petri sobre la superficie de trabajo de la campana. Haga un pequeño diagrama de la localización de cada una de ellas. Selle la caja restante con parafilm o película plástica, este será el testigo negativo.
- d) Destapar las cajas Petri y déjelas de esta manera por un periodo de aproximadamente una hora.
Nota: es importante que durante este tiempo, se evite realizar movimientos bruscos, abrir y/o cerrar puertas, ventanas o cualquier acción que pudiera alterar el resultado de la prueba.
- e) Tapar las cajas de Petri y siga las instrucciones dadas en el apartado II.
- f) Incubar las cajas y el testigo.

2. Monitoreo de la vida útil de los filtros HEPA.

Las campanas cuentan con un medidor de presión diferencial, localizado en el panel de control, que muestra la presión estática positiva existente en la cámara de alimentación de aire en una escala de 0 a 50 mm de agua. Inicialmente, cuando el filtro está "nuevo", la presión es aproximadamente de

15 mm de agua y dependiendo de la cantidad de partículas que se acumulen por retención en el filtro se irá incrementando.

Es conveniente llevar un registro de la presión diferencial y solicitar la medición del flujo de aire a cada incremento de 4 mm de presión.

3. Prueba de medición del flujo de aire salida del filtro HEPA.

Esta prueba se realiza con un flujómetro o anemómetro, haciendo pasar el sensor de aparato por toda la superficie del filtro, a una distancia aproximada de diez centímetros. Si no cuenta con el equipo necesario para ello.

4. Prueba de paso de partículas a través del filtro para partículas mayores a 0.3 micrones.

CUIDADOS Y MANTENIMIENTO

1. Mantener libre de polvo el cubículo donde se localice la campana.
2. Conectar la campana a una toma de corriente de 100 volts, aterrizada. Comprobar que no existen variaciones significativas de voltaje en la línea.

1.2.9 CENTRIFUGO DE AIRE

El aire es un reservorio importante de microorganismos, pero no es un medio de proliferación. Es un vector, un transportador de microorganismos procedentes del exterior o de la actividad en el local.

La necesidad de controlar el entorno de trabajo industrial y hospitalario impone instaurar controles microbiológicos del aire.

La utilización de este equipo permite estos controles.

De conformidad con normas en vigor, posee un caudal de aspiración garantizado a 100 L/min, así como una velocidad de impacto inferior a 20m/seg.

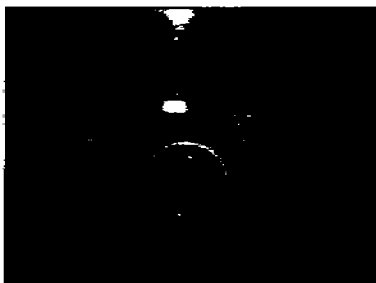


Foto: Centrífugo de aire por impactación

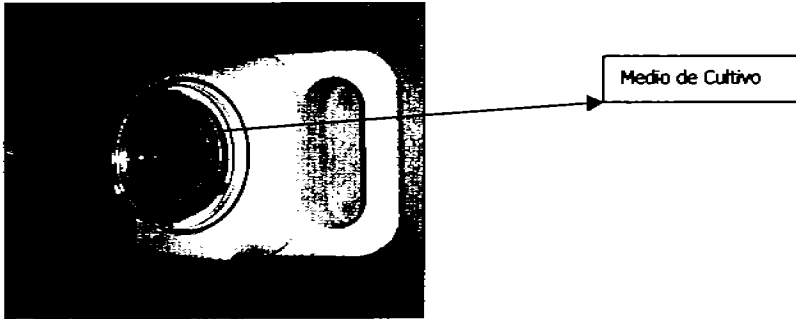


Foto: Centrífugo de aire con la placa del medio de cultivo para impactación

PRINCIPIO DE IMPACTACIÓN.

El papel de la impactación es separar las partículas del flujo de aire haciéndola impactar en una placa con medio de cultivo. Para ello, hay que acelerar fuertemente el flujo de aire por encima de la superficie de impactación.

El aire es aspirado por una turbina a través de una superficie tamizada. Cada orificio forma un chorro de aire que impacta las partículas en el agar colocado bajo la rejilla.

Una placa de lectura y de corrección estadística permite convertir el resultado leído en el laboratorio (UFC) en la cantidad más probable de microorganismos tomados por medio cúbico de aire.

PRECAUCIONES DE USO

- Verificar el estado higiénico del aparato y de las rejillas de toma de muestra
- Enroscar y desenroscar la rejilla de toma evitando el contacto con la zona perforada.
- Los medios de cultivo en placa Petri de 90 mm deben respetar las siguientes características:
 - Espesor mínimo d 2.5 mm
 - Superficie plana
 - No tiene aspecto deshidratado ni humedad excesiva.
- Mientras dura la toma de muestra, evitar efectuar movimiento inútiles, pasar delante del aparato, toser...
- Comenzar por las tomas de las zonas supuestamente menos contaminadas.
- Dar mantenimiento al aparato después de utilización: esterilización de las rejillas y limpieza del aparato.

- Esterilización de la rejilla de toma de muestra
- No utilizar acetona o solventes clorados para su limpieza, sólo una simple solución jabonosa y desinfectar con alcohol al 70%.

1.2.10 MICROSCOPIO

Es aquel instrumento que se utiliza para obtener una imagen aumentada de objetos minúsculos.

El tipo de microscopio más utilizado es el microscopio óptico, que se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta, los microscopios compuestos que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Hasta por encima de las 2.000 veces.

TIPOS:

- a) Microscopio óptico.
- b) Microscopio electrónico

MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO.

1. Comprobar que las lentes del ocular y de los objetivos estén limpias: de no ser así limpiar cuidadosamente con papel especial para óptica. No tocar las lentes con los dedos.
2. Colocar la preparación (sin cubre-objetos y con la muestra en la parte superior) sobre la platina sujetándola con el dispositivo móvil. Comprobar previamente que el objetivo de menor aumento está en posición de empleo.
3. Para bacteriología, iluminar la preparación bajando el condensador y con el diafragma abierto.
4. Colocar el objetivo de 10 aumentos (x10) y enfoque:
5. Pasar al objetivo de 40 aumentos (x40). Suba ligeramente el condensador. La imagen debe de estar casi enfocada; afine el foco con el micrométrico.
6. Empleo del objetivo de inmersión:
 - a. Girar el revolver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el objetivo de X40.
 - b. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el punto de luz.
 - c. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objeto de inmersión, asegurándose de que éste no toca la preparación pero sí la gota de aceite.
 - d. Enfocar cuidadosamente con el micrométrico.

- e. Finalizada la observación de una preparación y antes de retirarla de la platina, colocar el objetivo de menor aumento girando el revólver en el sentido hacia la lupa.
- f. Retirar la preparación y limpiar el objetivo de inmersión empleando un papel especial.

CUIDADOS Y MANTENIMIENTO

1. Si no se está utilizando el microscopio, éste debe estar guardado o bien cubierto por una funda de plástico con el fin de evitar que se ensucien y dañen las lentes.
2. No se deben tocar nunca las lentes con las manos.
3. No fuerce los dispositivos giratorios del microscopio (macro y micrométricos, platina, revolver y condensador).

1.3 REACTIVOS.

Identificación. Los reactivos químicos que ingresen al almacén del laboratorio deberán ser claramente identificados con los siguientes datos:

- a. Nombre químico y calidad (R.A., Q. P., USP, B. P., etc).
- b. Número progresivo de adquisición marcado en la tapa y en el frasco.
- c. Fecha de Adquisición Se llevará un registro de adquisición de reactivos en donde se consignen los datos arriba mencionados.

Registro general de reactivos. Para cada reactivo se llevará un registro en el que aparezcan los datos siguientes:

1. **Identificación**
2. Registro de movimientos en que se consignen fecha, cantidades (entradas y salidas) y saldo.
3. **Almacenamiento.** Los reactivos químicos serán almacenados en estantes abiertos, en un local ventilado y fresco, separando aquellos cuya evaporación o sublimación pueda resultar contaminante para los demás reactivos o dañar la etiqueta de los frascos que lo contienen. Para el almacenamiento de reactivos sujetos a evaporación o sublimación se tomarán las precauciones necesarias.

1.3.1 SOLUCIONES REACTIVO.

Estas comprenden aquellas de trabajo cuya concentración no esta sujeta a determinación analítica.

1. Identificación. Cada frasco con solución deberá tener una etiqueta que contenga los siguientes datos como mínimo:
 - a. Nombre del reactivo
 - b. Concentración (expresada como Peso/volumen :P/V, Volumen/volumen: V/V, etc.)
 - c. Fecha de preparación
 - d. Preparador
2. Protección. Las soluciones deberán estar contenidas en frascos adecuados, protegidos de la luz, de la evaporación y de todo aquello que pueda hacer variar su concentración y la integridad del soluto y del solvente.
3. Almacenamiento. Las soluciones reactivo deberán estar almacenadas en forma tal que se preserven de posibles alteraciones.
4. Fecha de caducidad. Las soluciones reactivo tendrán como vigencia, aquella en la que se haya demostrado que en el transcurso de la misma no hay alteración, pero su fecha de caducidad no será mayor a seis meses.

1.3.2 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Se dividirán en:

- Sustancias de Referencias primarias
- Sustancias de Referencias Secundarias
- Sustancias de Referencia Internas de trabajo

Las sustancias de Referencia Primaria serán aquellas que proporcionen los organismos autorizados. Las sustancias de Referencia Secundarias serán aquellas que se adquieran de fuentes confiables, como es el caso de COSUFAR, SUP, B. P., etc., para efectuar los análisis rutinarios con los métodos que aparecen en los textos aprobados.

Las sustancias de Referencia Internas de Trabajo son aquellas obtenidas de materias primas de alta calidad farmacopeica y cuyos parámetros se han comprobado mediante análisis efectuados por el propio laboratorio.

Estas categorías de Sustancias de Referencia se almacenarán por separado y su manejo cumplirá con los requisitos siguientes:

- a. Responsable. Se designará dentro de la organización del laboratorio, un responsable del registro, almacenamiento, surtido y reposición de las sustancias de referencia.
- b. Registro. Se llevará un registro para cada sustancia de referencia que contenga los siguientes datos:
 1. Origen
 2. Fecha de adquisición
 3. Cantidad adquirida
 4. Clave de entrada

Cada vez que utilice la Sustancia de Referencia se anotará en el registro:

1. Fecha de utilización
 2. Análisis en el que se empleó
 3. Responsable que la surtió
 4. Cantidad surtida
- c. Almacenamiento. Se almacenarán en condiciones tales que no se afecten sus características. Se les protegerá de condiciones de temperatura, humedad e iluminación inapropiadas. Dichas sustancias deberán almacenarse debidamente codificadas marcándolas con una clave que pueda permitir la localización de todos sus datos en los registros correspondientes.

1.3.3 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme; por ello, la variedad de medios de cultivo es también grande, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos. Daremos únicamente una idea general sobre algunos de los constituyentes habituales de un medio de cultivo.

IDENTIFICACIÓN. Para este efecto, seguir las indicaciones señaladas para reactivos químicos anotando la marca del medio de cultivo.

ALMACENAMIENTO. Los medios de cultivo se almacenarán aislados de los demás reactivos, en las condiciones de almacenamiento que indique el fabricante.

VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD. A cada medio de cultivo adquirido se le efectuarán las siguientes pruebas como mínimo:

- Promoción de crecimiento para microorganismos específicos del medio.
- Determinación de la sensibilidad.
- Determinación del pH antes y después de esterilizar el medio. Para cada medio, se recomienda diseñar estudios cualitativos y cuantitativos para su control, sobre todo para los selectivos o diferenciales.
- La calidad de los medios de cultivo se puede ver afectada por ciertos errores durante la preparación, los cuales se mencionan en la Tabla de Factores que afectan la calidad.

Se llevará un registro de la verificación de calidad en donde aparezcan los resultados obtenidos y todos los datos de identificación del medio, el nombre del analista y la fecha de análisis.

PREPARACIÓN DEL MEDIO. El técnico llevará un registro en que aparezcan los siguientes datos:

- Identificación del medio
- Método utilizado
- Pesadas
- Calidad del agua destilada (constancia de su calidad microbiológica y química).
- Material utilizado (constancia de lavado y esterilización).
- Control de la esterilización.
- Personal técnico
- Fecha de Preparación
- Fecha de caducidad
- Observaciones

CONTROL DEL MEDIO DE CULTIVO. A cada lote de medio preparado y antes de su utilización, se le efectuarán las pruebas necesarias siguiendo la metodología indicada en el inciso y se anotaran los resultados en el registro correspondiente.

TABLA DE FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DURANTE SU PREPARACIÓN.

FACTOR	CAUSA PROBABLE
Pesada incorrecta del producto	Error humano o mecánico
Empleo de productos alterados	Calor, humedad, oxidación u otros factores ambientales
Agua no adecuada	Presencia de sustancias inhibidoras o promotoras de crecimiento por alteraciones de las columnas desionizantes
Empleo de material sucio	Residuos de detergentes, sustancias químicas varias, 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
Alteraciones del medio por hidrólisis del agar, caramelización de carbohidratos, baja el pH, incremento de acción inhibidora, pérdida del colorante de los medios selectivos o diferenciales, formación de precipitados	Sobrecalentamiento durante la preparación y/o esterilización del medio. Esperar demasiado tiempo antes de distribuirlo en placas, tubos o frascos.
Esterilización defectuosa del medio	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.
El pH incorrecto	El pH no fue ajustado a temperatura ambiente.
Placas enriquecidas contaminadas	Empleo de suplementos o enriquecedores no satisfactorios.
Desarrollo microbiano dudoso o no característico.	No haber sometido los medios a pruebas promotoras de crecimiento
Alteraciones físicas de los medios ya preparados.	Manejo y almacenamiento inadecuados: falta de vigilancia de la temperatura, luz, humedad de los medios originales. Empaque defectuoso
Cantidad inadecuada de los medios ya preparados	Procedimientos y programa de control de medios no verificados y actualizados
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.
Ambiente No controlado	Fallas de mantenimiento de los sistemas de inyección de aire. Filtros inadecuados.

1.3.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

La identificación bacteriana se realiza tras el estudio de las características tintoriales, morfológicas y bioquímicas de los microorganismos. La identificación bioquímica se basa en la habilidad de las bacterias de producir enzimas fácilmente detectables, en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, etc. Con este fin, existen en el mercado una enorme variedad de medios de cultivo diseñados no sólo para permitir el crecimiento y multiplicación de los microorganismos, sino también para inhibir los de otros (medios selectivos) o resaltar determinadas características metabólicas (medios diferenciales).

Se tiene la forma clásica de las pruebas bioquímicas, que es mediante la preparación de diversos medios de cultivo selectivos ó diferenciales, sin embargo, actualmente éstos métodos están siendo sustituidos por micropruebas en sistemas semiautomáticos, que permiten una identificación más rápida y menos laboriosa.

Los más empleados en la industria farmacéutica es el API (que se detalla el procedimiento más adelante), y el BBL cristal de Becton Dickinson, los cuales parten del empleo de substratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para rehidratar los substratos, se utiliza una suspensión bacteriana correspondiente a las soluciones de McFarland. Las pruebas usadas en estos sistemas de identificación se basan en la utilización y degradación microbiana de substratos específicos detectados por sistemas indicadores.

ALMACENAMIENTO. Los medios de cultivo se almacenarán aislados de los demás reactivos, en las condiciones de almacenamiento que indique el fabricante.

No emplear pruebas bioquímicas con fecha de caducidad vencida.

1.4 MATERIAL BIOLÓGICO.

1.4.1 CEPARIO

La manera más adecuada para conservar cultivos microbianos puros es por medio de la liofilización, siempre y cuando se opere dentro de las condiciones específicas par cada microorganismo en particular.

Hay varios métodos alternativos de conservación de acuerdo con las características de cada microorganismo, las posibilidades del laboratorio y la experiencia del personal. Entre estos métodos se pueden mencionar: conservación en ampollitas con sangre desfibrinada, en soluciones de

glicerina sobre nitrógeno líquido (el manejo de éste requiere precauciones especiales), en líquidos nutritivos bajo congelación, bajo cepas de glicerina y parafina estériles, etc.

Sin embargo, el método más empleado es el de la siembra periódica de tubo a tubo.

RESIEMBRA. Para la siembra se emplean tubos de ensayo de 130 o 150 mm por 15 mm que se cubren con tapón de rosca o bien con algodón y gasa.

Se usan asas de 7 cm redondas y rectas con porta-asas adecuados.

Los mecheros utilizados deben proporcionar una amplia zona de protección bacteriológica que garantice la ausencia de microorganismos contaminantes.

Para el procedimiento de resiembra, se explicara mas a detalle en principales técnicas microbiológicas.

Se llevará un registro del número de resiembras así como de los resultados de control después de su incubación correspondiente.

ALMACENAMIENTO. Todas las cepas deberán ser almacenadas en condiciones tales que garanticen sus condiciones de actividad y pureza.

CONTROL. Cada cepa que se adquiere deberá ser verificada mediante tinciones, microscopía, bioquímica, etc y los resultados registrados con los siguientes datos:

- Identificación de la cepa
- Métodos de control
- Pruebas y resultados
- Analista
- Fecha de análisis

1.4.2 ANIMALES

El uso de a animales de laboratorio en las actividades de control de calidad de medicamentos y productos biológicos, constituye una de las etapas finales críticas en la tarea de producción de fármacos a nivel mundial. Para ello se requiere de un bioterio para mantenimiento de diversas especies de animales, principalmente conejos y ratones.

ORGANIZACIÓN INTERNA. Se debe contar con un programa de Medicina de Animales de laboratorio, está basado en la calidad y pertinencia que le sea conferido por el veterinario o bien el analista a cargo del bioterio.

Se deberá contar con un personal técnico y profesional especializado, entre los que sobresalen los analistas y el médico veterinario. Es conveniente organizarlo en forma general en tres áreas de responsabilidad bien definidas como se indica a continuación:

- a) Servicios médico veterinarios
- b) Servicios generales de cuidado animal
- c) Servicios administrativos

Por otro lado es necesario organizar los servicios del bioterio en secciones:

- Sección de adquisición y cuarentena de animales
- Sección de experimentación animal
- Área de limpieza

Para una mejor integración de los servicios, se debe considerar la necesidad de implementar algunos procedimientos que describan de forma extensiva los métodos de trabajo del mismo.

- Procedimiento de Operación: considerando Aspectos generales del bioterio, prácticas de cuidado y atención de animales experimentales, programa de cuarentena y medicina preventiva, programa de limpieza y sanitización.
- Procedimiento de métodos de Experimentación animal y eutanasia: Este deberá contener las recomendaciones generales para el uso de animales experimentales, manipulación de animales del laboratorio, métodos y vías de administración de fármacos, procedimientos de eutanasia.
- Procedimientos de cuarentena y acondicionamiento de animales: este deberá contener la recepción de animales, alojamiento, registro e identificación, Criterio de rechazo de animales, acondicionamiento, periodo de cuarentena.

1.4.3 LIOFILIZADOS

Los liofilizados más empleados en la industria farmacéutica son el Lisado de amebocitos de limulus (LAL) y endotoxinas bacterianas (*Escherichia coli*) empleados para la determinación de endotoxinas bacterianas (pirógenos) presentes en productos inyectables.

La reacción de endotoxina bacteriana y LAL fue reportada por primera vez por Bang en 1956 quien observó que el mecanismo de coagulación de la hemolinfa de *Limulus polyphemus* era inducida por

la invasión bacteriana que ocasionaba la muerte de éste cangrejo por coagulación intravascular. Mas tarde Bang y Levine en 1968, reportaron que el coagulo resultaba de la acción de la edotoxina sobre la proteína coagulable que se encuentra en los amebocitos circulantes del crustáceo.

La evidencia indica que se precisan cuatro sustancias para que se lleve a cabo la reacción de coagulación del lisado. Tres de ellas, la enzima procoagulante, las proteínas coagulables (coagulógenos) y los cationes divalentes de Calcio se hallan presentes en el lisado. La reacción se inicia en presencia de endotoxina (lipopolisacárido) de bacterias Gram-negativas. La temperatura óptima recomendada es de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un pH entre 6.0 y 7.5.

El mecanismo de la reacción implica la activación de la enzima procoagulante por calcio y endotoxina. Esta enzima activada cataliza el desdoblamiento del coagulógeno en subunidades de polipéptidos. La naturaleza química del coagulógeno y de sus subunidades coaguladas fue ampliamente estudiada en el *Tochypheus tridentatus*, una especie de cangrejo en herradura encontrado en el mar de Japón que tiene la misma respuesta a la endotoxina que el limulo.

El método de LAL por su rapidez, sensibilidad, exactitud, reproducibilidad y sobre todo por ser cuantitativo, es un magnifico instrumento de control de calidad para la valoración de pirógenos en agua, materias primas y productos terminados. Pudiendo incluso utilizarse para cuantificar endotoxina durante el desarrollo de un producto biológico.

El lisado de endotoxinas bacterianas también se emplean en la validación de un proceso de despirogenización de los hornos empleados para despirogenizar material tanto en el laboratorio de microbiología y en el área de inyectables.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD. Esta prueba se fundamente en comprobar la sensibilidad del lisado de limulus para considerar aprobado el empleo de este reactivo, posteriormente se dará a conocer en que consiste la técnica

1.5 PRINCIPALES TECNICAS MICROBIOLÓGICAS

1.5.1 PROCEDIMIENTO DE LIMITE MICROBIANOS DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES (MATERIAS PRIMAS, PRODUCTOS INTERMEDIOS Y TERMINADO)

La variedad de contaminantes de orígenes diversos (animal, vegetal, humano e incluso sintético) representa una de las causas más comunes de la contaminación que puede esperarse en un medicamento no estéril. Para verificar la calidad de los productos (materias primas y productos

terminados) las instituciones oficiales y la industria farmacéutica y farmoquímica, pueden utilizar diversos métodos de análisis, según sus necesidades.

Existen dos tipos de contaminación: primaria y secundaria. Contaminación primaria es aquella que se cuenta en de origen en la materia prima.

Contaminación secundaria es la que se introduce durante el manejo inadecuado de la materia prima o del producto terminado.

Microorganismos Objetables.

De acuerdo con la FEUM, son 4 los microorganismos patógenos que hay que investigar:

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*

Sin embargo hay microorganismos que aunque no son considerados patógenos por sus características, número y además por la composición del producto, pueden afectar la estabilidad de éste y/o indicar un manejo sanitario deficiente de la materia prima o medicamento, causando un problema de salud adicional al paciente. En consecuencia es conveniente tratar de aislar, identificar y reportar estos microorganismos, lo que permitirá conocer mejor las materias primas, exigir mejor calidad al proveedor, diseñar un seguimiento durante el proceso y ver si no se trata de una contaminación secundaria y así establecer las medidas que corrijan la falla.

I. MATERIAL

1. Pipetas serológicas graduadas de 5, 10 y 20 mL
2. Cajas Petri desechables
3. Frascos vacíos estériles de 160 mL con tapa
4. Espátulas
5. Balanza
6. Pinzas
7. Asas Bacteriológicas
8. Incubadoras de 35° y 25°C \pm 2°C
9. Autoclave
10. Frascos con 90 mL de caldo lactosado

11. Matraces con agar soya tripticaseína con solución de tween y lecitina de soya (solución inhibidora de conservadores).
12. Matraces con agar dextrosa Sabouraud con solución tween y lecitina de soya (solución inhibidora de conservadores).
13. Frascos con 45 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 estéril
14. Placas con medios selectivos:
 - Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
 - Agar eosina azul de metileno (EMB)
 - Agar Mc Conkey (McC)
 - Agar verde brillante (VB)
 - Agar Vogel Jonhson (VJ)
 - Agar cetrimida (Cet)
15. Galerías API
16. Reactivos para tinciones

II. PROCEDIMIENTO

1. Preparar siguiendo las indicaciones del proveedor para:

- ❖ Agar soya tripticaseína (AST)
- ❖ Agar dextrosa Sabouraud (ADS)
- ❖ Caldo lactosado (CL)
- ❖ Medios selectivos

1.1 Esterilizar de acuerdo al patrón de carga para cada uno.

1.2 Para los medios selectivos

1.2.1 Vaciar los medios estériles en placas Petri desechables 15-20 mL para cada una.

1.2.2 Dejar solidificar

2. Identificar el material

2.1 Un frasco vacío estéril (aplica sólo para producto terminado)

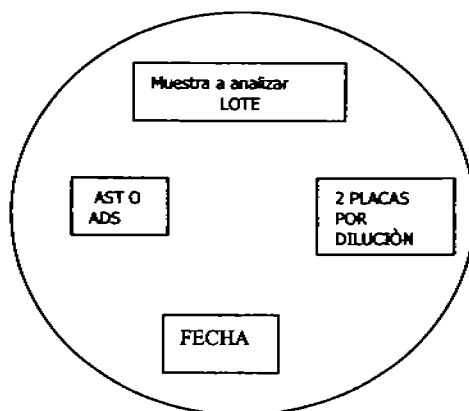
2.1.1 Un frasco conteniendo caldo lactosado (90 mL)

2.1.2 Identificar un frasco con buffer estéril con los mismos datos anexando dilución 1:10 ó 1:100 con lo siguiente:

- ❖ Nombre del producto

- ❖ Lote
- ❖ Fecha
- ❖ Dilución
- ❖ Analista

2.1.3. Identificar placas desechables en la tapa como se observa en la siguiente ilustración:



3. Análisis de la muestra

3.1 El personal que lleve a cabo el análisis debe conocer los procedimientos de cada lugar donde la vaya a realizar (campana de flujo laminar).

- 3.1.2 Transferir el material necesario a la campana de flujo laminar.
- 3.1.3 Colocar el material de manera que no obstruya el flujo del aire.
- 3.1.4 Sólidos líquidos, tabletas y grageas.
- 3.1.5 Tomar el frasco de caldo lactosado identificado para la muestra y dentro de la campana desenrosque la tapa.
- 3.1.6 Para el caso de los sólidos, sanitizar la balanza y colocar dentro de la campana de flujo laminar, de manera que pueda utilizarla fácilmente. Colocar el frasco en el plato de la balanza.
- 3.1.7 Tarar el frasco
- 3.1.8 Abrir el frasco y agregar 10 g ó 10 mL de muestra (dilución 1:10)

NOTA: Trate de hacer el menor número de movimientos para evitar la contaminación de la muestra.

- 3.1.9 Homogenizar la muestra agitando en el vortex.
- 3.1.10 Inocular por duplicado 3 mL de la muestra a cada placa identificada para el producto.
- 3.1.11 Tomar 5 mL de la muestra 1:10 y transferir en el frasco que contiene 45 mL de buffer estéril identificado para la muestra.
- 3.1.12. Homogenizar la muestra, con el vortex (dilución 1:100).
- 3.1.13. Inocular por duplicado 3 mL para cada placa, de esta última dilución a las placas que están identificadas como 1:100.
- 3.1.14. Agregar a cada caja de 15 a 20 ml del medio de agar de soya tripticaseína con tween y lecitina o agar dextrosa Saboraud previamente esterilizado y puesto en baño de agua a una temperatura aproximada de 45°C a 48°C.
- 3.1.15. Con movimientos suaves rotatorios, mezclar la alícuota de la muestra con el medio de cultivo, evitar derramar líquido.
- 3.1.16. Dejar solidificar el medio de cultivo e incubar las placas en posición invertida a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 48-72 horas para el recuento de mesófilos y de $22.5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 5 a 7 días para hongos filamentosos y levaduras.

4 Investigación de microorganismos objetables.

Llamamos microorganismos objetables, a aquellos patógenos que podrían presentarse en un producto o materia prima y que debemos detectar mediante la utilización de medios selectivos o enriquecidos para poder dar un dictamen al final de la prueba, de ausencia ó presencia.

- 4.1 Tomar el frasco con caldo lactosado e incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por el lapso de 18 a 24 horas.
- 4.1.1 Transcurrido el tiempo de incubación, realizar la siembra en medios selectivos de aquellos caldos donde observe crecimiento para detectar microorganismos objetables.
- 4.1.2 Sanitizar perfectamente la mesa
- 4.1.3 Enciender el mechero.
- 4.1.4 Esterilizar a la flama el asa bacteriológica.

a) **Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Tomar una asada del cultivo anterior y sembrar por estría cruzada en agar cetrimida. Incubar y observar morfología colonial.

a) Identificación de *Salmonella*.

Tomar un mL del caldo lactosado con una pipeta estéril y resembrar en 10 mL de caldo selenitocisteína y en 10 mL de caldo tetrionato, Mezclar e incubar de 18 a 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, tomar una asada de cada uno de los medios y resembrar por estría cruzada en los medios: agar verde brillante, agar xilosa-lisina-desoxicolato o agar sulfito bismuto. Incubar 24 horas a 35°C, observar la morfología microscópica y colonial.

b) Identificación de *Escherichia coli*.

A partir del caldo lactosado resiembra por estría cruzada el medio agar levine azul de metileno o agar McConkey, incubar a 35°C por 24 horas, observar la morfología colonial.

NOTA: Confirme el resultado de las pruebas anteriores, realizando identificación mediante pruebas bioquímicas.

5 Resultados

5.1 Después del periodo de incubación de las placas, realizar el conteo de colonias en cada una de ellas auxiliándose para ello del contador de colonias.

5.1.1. Calcular el promedio de las UFC con la siguiente ecuación:

$$UFC = \frac{\sqrt{UFC_1 + 0.5} + \sqrt{UFC_2 + 0.5}}{2} - 0.5$$

UFC₁ = UFC de la placa 1

UFC₂ = UFC de la placa 2

5.1.2. Determinar el número de colonias mediante el factor de dilución.

5.1.3. Multiplicar por el factor de dilución.

5.1.4. Dividir entre tres (el volumen de alícuota adicionado a cada placa).

5.1.5. Informar el número de UFC por gr o mL del producto.

5.1.6. Placas sin colonias; reportar como menos de 10 UFC/mL o g para mesófilos.

5.1.7. La materia prima es aceptada si cumple con los requerimientos.

5.1.8. El producto intermedio y/o terminado es aceptado si cumple los requerimientos.

5.1.9. Las materias primas y productos (intermedio y terminado) son aceptadas siempre que no se aislen microorganismos indeseables.

5.1.10. En caso de tener un producto o materia prima con una cuenta microbiana muy cercana al límite o fuera de éste, así como presencia de microorganismos objetables, realice lo siguiente:

- ✓ Realice un muestreo riguroso a la materia prima o al producto.
- ✓ Analice nuevamente la muestra siguiendo cada uno de los pasos de este procedimiento.
- ✓ Determine el número de UFC/g o ml, así como la presencia de microorganismos objetables.
- ✓ Aplique dictamen de APROBADO si cumple con especificaciones de acuerdo a lo indicado en la Farmacopea, a la monografía de cada producto o materia prima o simplemente a especificaciones internas de la empresa, que las determino mediante estudios validados.

IV. REFERENCIAS

1. FEUM 7^a Edición, 2000. Pág. 312-319
2. USP 26 NF 21, 2003. Pág. 1681-1686
3. NOM-092-SSA1-1994

V. ANEXO I PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución Buffer de fosfatos pH 7.2 (concentrada)

1. Con una probeta medir 500 mL de agua desionizada
2. Transferir a un matraz aforado de 1000 mL.
3. Pesar 34 g de fosfato de potasio monobásico.
4. Disolver en el agua desionizada.
5. Ajustar el pH a 7.2 ± 0.1 , con hidróxido de sodio 1N (aproximadamente 175 ml).
6. Aforar la solución.
7. Distribuir en frascos de boca ancha 100 mL y esterilice a 121°C, 15 lb, durante 45 minutos.

Solución Buffer de fosfatos pH 7.2 (diluída)

1. Tomar un mL de la solución concentrada y transferir en una probeta de 1000 mL
2. Adicionar a la probeta 800 mL de agua desionizada

3. Distribuir la solución diluida colocando 45 mL en cada frasco.
4. Esterilizar a 121°C 15 lb. , durante 45 minutos.
5. Esta última solución es la de uso
6. Solución inhibidora de conservadores.

Solución de Tween al 50% (T)

1. Mezclar 50 mL de tween 80 con 50 mL de agua.
2. Calentar hasta disolución.
3. Agregar 10 mL por cada 100 mL de caldo de soya

Solución neutralizante (N)

1. Pesar 8 g de tween 80 y 1 g de lecitina.
2. Disolver en 100 mL de agua
3. Calentar hasta ebullición
4. Dejar la solución reposar hasta que ésta sea transparente.
5. Agregar 10 mL por cada 100 mL de agar (agar soya tripticaseína o agar dextrosa Saboraud)

VI. ANEXO 2 MICROORGANISMOS OBJETABLES

Características de Pseudomonas aeruginosa

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCOPICA
Agar Cetrimida	Colonias verdes azulosas, con luz ultravioleta se observan de color verde fluorescente	Bacilos Gram negativos Prueba de Oxidasa positiva

Características de Escherichia coli

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCOPICA
Agar McConkey	Colonias grandes rosas-rojas rodeadas de una zona de precipitación	Bacilos Gram negativos
Agar Levine-Eosina-Azul de Metileno	Colonias pequeñas azul-negro con brillo verde metálico de color verde.	Bacilos Gram negativos

Características de Salmonella spp

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCOPICA
Agar Verde Brillante	Colonias pequeñas transparentes incoloras rosas o blancas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja	Bacilos Gram negativos
Agar Xilosa-Lisina Desoxicolato	Colonias que no modifican el medio, rojas con o sin centro negro.	Bacilos Gram negativos
Agar Sulfito Bismuto	Colonias negras o verdes	Bacilos Gram negativos
Agar Fierro Triple Azúcar	Superficie alcalina(roja), picadura ácida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfúrico (negro).	Bacilos Gram negativos

1.5.2 PROCEDIMIENTO DE CONTROL AMBIENTAL EN AREAS LIMPIAS

El grado de contaminación microbiana en el medio ambiente, está influido por factores tales como la frecuencia de ventilación, el número de personas presentes y la naturaleza y grado de las actividades que realizan los individuos dentro de los locales. En la industria farmacéutica se requiere un control microbiológico del ambiente ya que los medicamentos pueden contaminarse durante su fabricación por el aire, equipos, superficies de trabajo o el personal.

La industria farmacéutica debe cumplir unas normas de correcta fabricación que garanticen la calidad microbiológica de los medicamentos (NOM- 059:SSA1-1993, a la GUÍA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA PARA CUARTOS LIMPIOS, 1989, MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CLEANROOMS AND OTHER CONTROLLED ENVIRONMENTS, 1995 el cual es desarrollado en la USP.)

La presencia y crecimiento de microorganismos en productos ya terminados, puede ocasionar riesgo para la salud, o bien alterar características físico-químicas que impedirán su comercialización. Por esta razón las zonas de producción deben mantenerse en unas condiciones higiénicas con niveles mínimos de microorganismos y partículas no viables.

La frecuencia de muestreo esta establecida según el tipo de área, además de los datos obtenidos durante los monitoreos ambientales sirven como referencia histórica para que cada empresa establezca sus límites propios de alerta y de acción que se pueda implementar métodos de control microbiano necesarios en cada caso, asesorándose de la ISO 9002-1116.

Así mismo la identificación de los microorganismos que aparecen con más frecuencia nos llevará a saber su posible origen y tomar las medidas necesarias para evitar sus entradas en áreas limpias y así permitir una desinfección más correcta.

Existen diferentes métodos para un control ambiental: el de impactación mediante un equipo especial el cual evalúa los microorganismos en el aire, el de superficies que se lleva acabo mediante placa rodac, el de personal utilizando el mismo método que el anterior y por último el de gravedad mediante la exposición de placas con agar el cual se explicará a continuación.

I. MATERIAL

- Agar Soya Trypticaseína (AST)
- Agar Dextrosa y papa (ADP)
- Cajas Petri estériles
- Transportador de placas Petri

- Guantes
- Piceta con alcohol al 70%
- Cuenta colonias

II. PROCEDIMIENTO

1. A partir del medio de cultivo preparado y estéril, verter en cajas Petri estériles, aproximadamente 20 mL de medio (Agar soya tripticaseína AST o agar dextrosa papa ADP) según el caso, en condiciones asépticas y dejar gelificar, sobre una superficie uniforme.
2. Rotular las placas con agar soya tripticaseína y agar dextrosa papa; una por cada punto a monitorear con los siguientes datos:
 - Medio de cultivo (AST o ADP)
 - Punto de exposición (Número)
 - Departamento
 - Fecha
3. Colocar dentro del transportador de placas en el orden de exposición, así como la piceta con alcohol.
4. Dirigirse al área correspondiente a monitorear.
5. Colocarse los guantes y sanitizar con alcohol al 70%.
6. Colocar una placa con agar soya tripticaseína, y una placa con agar dextrosa papa en cada punto a monitorear, comenzando por los puntos internos a monitorear hasta la parte externa, del lugar. Abrirlas completamente al momento de exponer. Ver imagen



Foto: Personal del área de microbiología realizando exposición de placas

7. Dejarlas expuestas durante 30 min., transcurrido este tiempo comenzar a cerrarlas en el orden en que fueron expuestas y colóquelas dentro del transportador de placas.
8. Trasladarlas al área de Microbiología.

9. Colocar las placas de agar soya tripticaseína dentro de la incubadora cuyo intervalo de temperatura sea de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, y las placas de agar dextrosa papa en la incubadora que mantienen una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 días.

10. Durante el periodo de incubación leer las placas diariamente.

11. Registrar en la bitácora correspondiente al área monitoreada con los siguientes datos:

- Fecha de exposición
- Hora de exposición
- Fecha de reporte
- Producto
- Lote
- Sanitizante en uso
- Lote de medios empleado

12. Al término de la incubación, los resultados obtenidos reportar en la bitácora y formato correspondiente

NOTA: La exposición de cada área se realizará con la frecuencia que de manera interna cada empresa considere y de acuerdo al programa de control ambiental que se establezca.

III. CRITERIO DE ACEPTACIÓN

1. Las áreas cumplen con los requisitos de un área limpia si los resultados se encuentran dentro de los límites establecidos.
2. En caso de que los resultados superen las tres cuartas partes del límite establecido; aún antes de concluir el periodo de incubación, se debe informar al supervisor del área, así como al supervisor de control en proceso para que se lleven a cabo las acciones correctivas inmediatas, sean verificadas y se realice el control ambiental con el fin de corroborar la eficacia de la acción correctiva.

1.5.3. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DE ESTERILIDAD

La fabricación de productos farmacéuticos incluye un grupo de medicamentos que deben ser estériles y entre los que se incluyen los productos inyectables, óticos y oftálmicos.

La prueba de esterilidad se realiza de acuerdo a los métodos oficiales indicados en las farmacopeas en las que se describen las pruebas directa e indirecta. La prueba de esterilidad se fundamenta en la detección de formas viables de microorganismos en medios de cultivo adecuados que se encuentran como contaminantes en productos estériles, estos ensayos se deben realizar en áreas de trabajo asépticas que tengan un control ambiental adecuado, es necesario tener todos los controles que requiere dicha prueba para una interpretación adecuada.

Antes de efectuar cualquier prueba de esterilidad, debe determinarse si el producto en cuestión tiene propiedades bactericidas o bacteriostáticas y si contiene preservativos o cualquier otra sustancia que posea este efecto.

Los medios de cultivo empleados en esta prueba deben haber mostrado que son capaces de permitir la proliferación de microorganismos diversos, tanto en condiciones aerobias como anaerobias y especialmente el crecimiento de los microorganismos presentes en el ambiente donde se realizan las operaciones de fabricación. El tamaño de muestra va a depender del producto a analizar. Se debe tomar en cuenta la etapa en la cual se encuentra el producto. La muestra debe ser representativa de todo el lote.

I. MATERIAL

1. Filtros estériles
2. Matraz Kitazato.
3. Bomba de vacío
4. Pinzas estériles
5. Vaso de precipitado
6. Tubo con 100 mL de tioglicolato estéril
7. Frasco con 100 mL de tripticaseína estéril
8. Tubos con 100 mL de peptona de caseína al 1% estéril
9. Placas con agar Soya Tripticaseína (AST)
10. Placas con agar Dextrosa y Papa (ADP)
11. Piceta con alcohol al 70%
12. Piceta con sanitizante

II. PROCEDIMIENTO

1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

1.1 Para cada prueba a realizar prepare lo siguiente y testigo negativo:

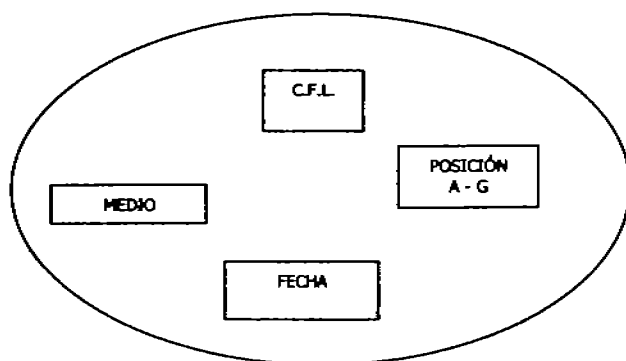
- ✓ Frasco con caldo soya tripticaseína, estéril
- ✓ Tubo con medio líquido de tioglicolato
- ✓ 2 tubos con peptona al 1% estéril

Nota: Verifique que la fecha de preparación de los medios no exceda de 48 horas y que no sea menor de 24 horas.

1.2 Identificar cada uno de los frascos que contienen los medios con los siguientes datos:

- ✓ Nombre del producto o testigo negativo
- ✓ Número de lote
- ✓ Fase del proceso
- ✓ Fecha de inicio del análisis
- ✓ Fecha de fin de análisis

1.3 Rotular 6 placas de AST y 6 placas de ADP de la siguiente forma:



1.4 En caso de contar con producto terminado acondicionar el material como sigue:

1.4.1 Colocar las ampollas en un vaso de precipitados de capacidad suficiente

1.4.1.1 Si el contenido de la ampollita es de un mL colocar 100 ampollitas

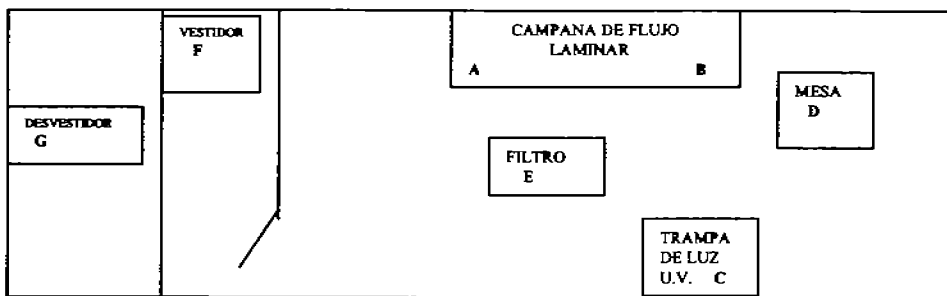
- 1.4.1.2 Si el contenido de las ampollitas es de 2 mL colocar 50 ampollitas
- 1.4.2. Adicionar alcohol al 70% hasta que se cubran totalmente las ampollitas
- 1.4.3 Dejar las ampollitas en el alcohol por lo menos 30 minutos antes de realizar la prueba
- 1.4.4 Colocar papel aluminio previamente sanitizado en la parte superior del vaso.
- 1.4.5. Identificar el vaso de precipitado con los siguientes datos:
 - ✓ Nombre del producto
 - ✓ Número de lote
 - ✓ Fecha
- 1.4.6. Incluir en el material un frasco vacío estéril para cada producto terminado e identificado para la muestra.
- 1.5 *En caso de Materia Prima estéril.*
 - 1.5.1. Incluir al material un matraz con 100 mL de peptona al 1% estéril, previamente identificado para la muestra.
- 1.6 *En caso de Material de Empaque estéril*
 - 1.6.1. Incluir al material un frasco con 100 mL de agua estéril, previamente identificado para la muestra.
- 1.7 Realizar la sanitización de una charola de acero inoxidable colocar en ella el material acondicionado.
- 1.8 Realizar la sanitización de la trampa de la siguiente forma:
 - 1.8.1. Limpiar con una gasa impregnada con el sanitizante en turno de adentro hacia fuera
 - 1.8.2. Comenzar por el techo de la trampa y terminar en la base de la trampa
 - 1.8.3. Realizar la sanitización de la puerta de la trampa con alcohol al 70 %
 - 1.8.4. Colocar la charola que contiene el material en la trampa de luz U.V. durante 20 minutos
 - 1.8.5. Transcurridos los 20 minutos apagar la lámpara.

2. REALIZACION DE LA PRUEBA

- 2.1 Ingresar al área
- 2.2 Verificar la fecha de esterilización del uniforme no exceda de 48 horas
- 2.3 Colocarse el uniforme para ingresar al área aséptica
- 2.4 Encender la inyección de la campana de flujo laminar
- 2.5 Realizar la sanitización de la campana
- 2.6 Introducir el material colocado en la trampa y colocar en la mesa
- 2.7 Exponer las placas para el control ambiental del área como se muestra en la Figura 1, describiendo a continuación cada una de ellas.

- a) Campana lado derecho
- b) Campana lado izquierdo
- c) Trampa de luz U.V.
- d) Mesa
- e) Debajo del filtro del área aséptica
- f) Vestidor
- g) Desvestido

Figura 1. Plano del área aséptica de Microbiología



NOTA: Los puntos de exposición F y G, se expondrá conforme se va ingresando al área.

2.8 Encender el mechero.

2.9 ANALISIS DE PRODUCTO TERMINADO

2.9.1 Colocar una gasa estéril a un extremo de la base del gabinete de la campana

2.9.2 Tomar las ampollitas del vaso y colóquelas sobre esta.

2.9.3 Esperar un momento a que el alcohol se evapore.

2.9.4 Colocar una segunda gasa frente al mechero y pasar la mitad de las ampollitas a esta

2.9.5 Sujetar un rompe ampollitas apirógeno y saque de su envoltura

2.9.6 Frente al mechero abra las ampollitas una a una y colocar formando líneas diagonales.

Nota: Se realiza de esta forma para no obstruir el flujo de aire.

2.9.7 Vaciar el contenido de las ampollitas en el frasco estéril identificado para la muestra.

2.9.8 Una vez terminado, colocar la otra parte de ampollitas en la gasa y realizar lo mismo.

2.10. MATERIAL DE EMPAQUE

2.10.1 Jeringa

2.10.2 Colocar una gasa estéril a un extremo de la base del gabinete de la campana

- 2.10.4 Tomar las ampollitas del vaso y colocar sobre esta.
- 2.10.5 Esperar un momento a que el alcohol se evapore
- 2.10.6 Colocar una segunda gasa frente al mechero y pasar la mitad de las ampollitas a esta
- 2.10.7 Sujetar un rompe ampollitas apirogénico y sacar de su envoltura
- 2.10.8 Frente al mechero abrir las ampollitas una a una y colocar formando líneas diagonales.
- 2.10.9 Con ayuda de una jeringa estéril colocar agua estéril a cada una de las ampollitas
- 2.10.10 Enjuagar el interior de la ampollita y colocar el agua en un frasco estéril identificado
- 2.10.11 Realizar lo mismo para el resto de las ampollitas hasta completar 50 muestras

Nota: Realizar este paso tomando en cuenta la capacidad de la ampollita

- 2.11 Vaciar la muestra en el filtro estéril
- 2.12 Aplicar a presión negativa
- 2.13 2.14 Una vez filtrada toda la muestra, adicionar el contenido de dos tubos de peptona al 1%
- 2.14 Quitar la pinza que sujeta el filtro
- 2.15 Tomar unas pinzas estériles, y quitar la envoltura
- 2.16 Colocar el filtro a la mitad de la membrana y corte esta.
- 2.17 Colocar una mitad de la membrana en el caldo soya tripticaseína
- 2.18 Depositar la otra mitad de la membrana en el medio líquido de tioglicolato.
- 2.19 Realizar un testigo negativo de la siguiente forma
- 2.20.1 Filtrar el contenido de dos tubos de peptona
- 2.20.2 Realizar lo mismo a partir del 2.13
- 2.20 Apagar el mechero
- 2.21 Concluido el análisis recoger el material de la campana
- 2.22 Retirar las placas expuestas para el control ambiental del área
- 2.23 Apagar la campana de flujo laminar
- 2.24 Colocar todo el material en la trampa
- 2.25 Realizar la sanitización de la campana
- 2.26 Verificar que este cerrada la llave del gas y la llave de la bomba de vacío.
- 2.27 Salir del área y desvístase de la misma forma que llevo a cabo el vestido.
- 2.28 Incubar el caldo soya tripticaseína y las placas de ADP a 25°C
- 2.29 Incubar el medio líquido de tioglicolato y las placas de AST a 35°C

III CRITERIO DE ACEPTACIÓN

LA PRUEBA DE ESTERILIDAD ES SATISFACTORIA SI:

1. Al examinar durante y al concluir el periodo de incubación establecidos en el medio líquido de tioglicolato no se observa turbidez o crecimiento en la superficie, por lo tanto el producto, materia prima y material de empaque cumplen con la prueba de esterilidad.
2. Al examinar durante y al concluir el periodo de incubación establecidos en el caldo soya tripticaseína no se observa turbidez o crecimiento en el medio, por lo tanto el producto, materia prima y material de empaque cumplen con la prueba de esterilidad.
3. La prueba se rechaza si se encuentra crecimiento bacteriano (al observar la turbidez del medio).
En el caso de ser rechazada la prueba debe ser realizada con el doble de muestras.

IV. REFERENCIAS.

1. FEUM 7ª Edición(2000) Pág. 269-274
2. USP 24 NF (2002) PP 2011-2016.

1.5.4 PROCEDIMIENTO PARA RECEPCIÓN Y CONSERVACIÓN CEPAS

I. MATERIAL Y EQUIPO

1. Tubos de ensaye de 20 x 150 mm
2. Agar de Soya Tripticaseína
3. Agar Dextrosa Sabouraud
4. Agar B12
5. Caldo Micro inóculo
6. Gradilla
7. Mechero
8. Autoclave
9. Pipetas graduadas de 10 mL
10. Cepa requerida especificando genero y especie así como la tipificación del microorganismo que se requiere.

Al recibir la cepa verifique lo siguiente:

- 1.-Que sea la cepa correcta.
- 2.- Crecimiento característico
- 3.-Certificado de análisis de la institución que proporciona la cepa (IPN, SSA, PROQUIFA, ETC.)

- 4.-Registre cada una de las resiembras de la cepa en la bitácora correspondiente
- 5.-Lleve a cabo el primer traspaso, en cajas petri con AST o ADS dependiendo si el microorganismo es un hongo o una bacteria respectivamente, con el fin de verificar sus características morfológicas.
- 6.-Una vez transcurrido el tiempo de incubación, realice su identificación mediante tinciones y pruebas bioquímicas.

a) Conservación de cepas

b)

Con el fin de mantener la integridad de los microorganismos que constituyen el cepario, mensualmente se deben hacer resiembras de todos los microorganismos en los medio de cultivo y condiciones que se describen en la Tabla.

TABLA Microorganismos que constituyen el cepario

CEPA	TIPIFICACION	MEDIO DE CONSERVACION
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	Agar Dextrosa Sabouraud
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Agar Soya Tripticaseina
<i>Bacillus cereus var Mycolides</i>	ATCC 11778	Agar Soya Tripticaseina
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Agar Dextrosa Sabouraud
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	Agar Soya Tripticaseina
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11105	Agar Soya Tripticaseina
<i>Lactobacillus leichnamii subespecie lactis</i>	ATCC 7830	Agar Vitamina B ₁₂
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 2896	Agar Soya Tripticaseina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	Agar Soya Tripticaseina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25619	Agar Soya Tripticaseina
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	ATCC 13637	Agar Soya Tripticaseina
<i>Salmonella enteritidis ser Typhimurium</i>	CDC 10	Agar Soya Tripticaseina
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341	Agar Soya Tripticaseina
<i>Serratia marcescens</i>	NCTC 9986	Agar Soya Tripticaseina
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Agar Soya Tripticaseina
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 p	Agar Soya Tripticaseina
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Agar Soya Tripticaseina
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 8043	Caldo Micro isócolo

NOTA: El tiempo y temperatura de incubación en bacterias es 35°C +/- 0.2 de 24 a 48 horas, los hongos y levaduras durante 5 días a una temperatura de 25°C +/- 0.2

4. Preparar los medios de cultivo de acuerdo al procedimiento y distribuir en tubos de ensaye de 20 x 150 mm, un volumen de 10 mL en cada uno. Considerando tres tubos por cada microorganismo a resembrar.

4.1 Rotular tres tubos con los siguientes datos como muestra la etique de abajo:

- ✓ Nombre del microorganismo
- ✓ Tipificación
- ✓ Identificación
- ✓ Analista
- ✓ Fecha
- ✓ Lote de medios

Etiqueta para rotular tubos del cepario.

Cepa: <u>Escherichia coli</u>	Tipificación: <u>ATCC10536</u>
Identificación: <u>1/3 R</u>	Analista: <u>O.F.B. XXXXX</u>
Fecha: <u>25 febrero 2006</u>	Lote de medio: <u>00004567</u>

4.2 La siembra de cada microorganismo se realizará por triplicado con la siguiente identificación.

4.2.1 1/3 R (Resiembra): Este tubo se emplea únicamente para tomar el inóculo mensual, con el que se renueva el cepario.

4.2.2 2/3I (Identificación): Se emplea para tomar la muestra y realizar la tinción y la bioquímica correspondiente, cada mes que se realiza la resiembra o en caso de existir algún problema con la cepa que se emplea.

4.2.3 3/3 U (Uso): Este tubo es el que se utiliza en el laboratorio habitualmente, para realizar las resiembras de los microorganismos que se emplean en los análisis

5. Sanitizar perfectamente el área de trabajo con el sanitizante en turno y cree condiciones asépticas usando el mechero.

6. Inocular con asa bacteriológica, previamente esterilizada a la flama. Trasladar el inóculo a la superficie del medio y sembrar por estria cerrada, en el caso de bacterias.

7. En el caso de hongos filamentosos sembrar por picadura en distintos puntos del medio a inocular.

8. Para la siembra de microorganismos anaerobios, como en el caso de *Lactobacillus leichmanii* subespecie *lactis*, se utiliza un asa recta, se inocula por picadura evitando tocar el fondo del tubo.

9. Para resembrar microorganismos que requieran de medios líquidos para su crecimiento (*Streptococcus faecalis*), se efectúa con asa recta a partir de la muestra, agitándolo dentro del medio

10. Incubar a las condiciones de temperatura y tiempo adecuados para cada microorganismo.

11. Una vez concluido el tiempo de incubación:

12. Describir las características morfológicas de las colonias.

13. Observar la morfología microscópica de cada microorganismo, realizar la tinción requerida basándose en el procedimiento correspondiente.
13. Realizar las pruebas de identificación indicadas para cada microorganismo de acuerdo al procedimiento.
14. En el caso de aquellos géneros que muestren crecimiento característico en medios selectivos, resembrarlos y observar la morfología colonial característica.
15. CEPARIO: El cuál contendrá aquellas cepas empleadas para resiembra e identificación.
16. CEPARIO EN USO: Almacene los tubos con identificación 3/3 U.
17. Los resultados obtenidos en las tinciones, así como el crecimiento en medios selectivos se registra en la bitácora de resiembras
18. El resultado impreso de la prueba bioquímica aplicada en la carpeta de bioquímicas

III RESULTADOS

1 Se considera que los microorganismos pertenecientes al cepario son aptos para su uso en el laboratorio de microbiología siempre y cuando:

- a) El crecimiento morfológico de las colonias es característico del microorganismo.
- b) La morfología colonial en medios selectivos corresponde a la indicada para cada uno.
- c) La tinción realizada al tipo de microorganismo y no se observa contaminación por algún otro.
- d) Las pruebas bioquímicas aplicadas muestran reacción característica del microorganismo.

IV CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Este procedimiento cumple si se llevan a cabo todos y cada uno de los pasos anteriormente descritos.

V REFERENCIAS CONSULTADAS

1. Guía para el control microbiológico de Medicamentos CIPAM 1992

1.5.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS POR EL METODO DEL API

La contaminación de productos farmacéuticos con ciertos microorganismos puede tener consecuencias graves para los usuarios, por lo que es importante conocer las técnicas de laboratorio para su aislamiento e identificación.

Existen en el mercado una serie de sistemas de identificación para microorganismos, los cuales parten del empleo de reacciones bioquímicas. En nuestro caso se mencionará el sistema del API.

I MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS.

- Galerías y reactivos API:API 20E, API 20 NE, API STAPH, API 20 STREP, API 20C AUX, API 50 CHB.

- Aceite de parafina
- Incubadoras
- Asas Bacteriológicas
- Mechero
- Cepas de Referencia
- Pipetas
- Gradilla
- Jeringas estériles de 3 o 5 ml
- Software de identificación

MEDIOS DE SUSPENSIÓN

C médium

GP Médium

API Staph Medium

API 50 Cit Medium

Cit No médium

REACTIVOS REVELADORES

TDA

James

VP1, VP2
NIT1, NIT2
Zinc
Zim a y Zim B

DESCRIPCION DE LAS GALERIAS

La galería API, incluye microtubos que contienen sustratos deshidratados. Estos se inoculan con una suspensión bacteriana. Cuentan además en la parte superior con una cúpula la cuál nos sirve para crear un ambiente de anaerobiosis al inocular aceite de parafina o también para algunas pruebas que requieran mayor cantidad de inóculo.

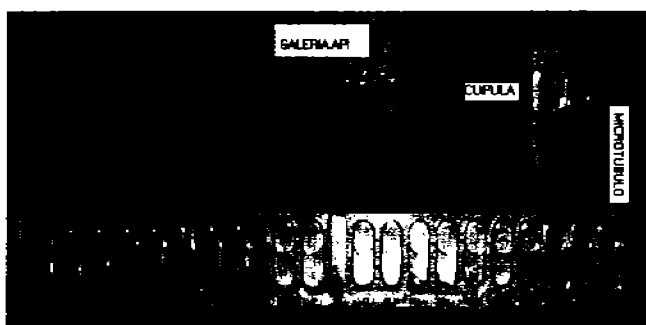


Foto 1: Galería API

La cámara de incubación consta de un fondo y una tapa de acetato (ver Foto 2). El fondo cuenta con pequeños alvéolos cóncavos donde se deposita agua para crear una atmósfera húmeda. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, ya sea espontáneo o bien provocados mediante la adición de reactivos.

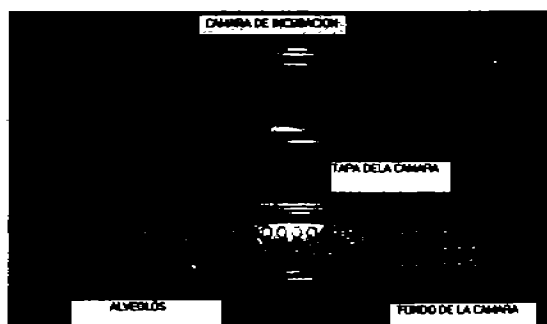


Foto 2: Cámara de incubación

II PROCEDIMIENTO

1. Muestras

Los microorganismos a identificar deben aislarse en una primera fase sobre un medio de cultivo (Agar de Soya Tripticaseína ó Agar Dextrosa Sabouraud según aplique) incubar por 24 hrs para bacterias y 27 horas para Hongos, previa identificación.

2. Preparación de la galería

a) Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 mL. de agua destilada o desmineralizada en los alvéolos para crear la atmósfera húmeda.



Foto 3: incubación de la cámara de incubación

b) Escribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara. Foto 4



Foto 4: identificación de la prueba.

- c) Sacar la galería de su envase.
- d) Colocar la galería en la cámara de incubación

3. Preparación del inóculo

API 20 E

- Abrir una ampolleta de NaCl 0.85% (5 mL) o de API suspensión Médium (5 mL), ó utilice 5 mL de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.
- Tomar una asa bacteriológica previamente esterilizada a la flama una colonia bien aislada sobre el medio. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (8-24 hrs.)
- Realizar una suspensión bacteriana homogenizando cuidadosamente las bacterias en el medio. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación. Foto 5



Foto 5: Suspensión bacteriana

API 20 NE

- Abrir una ampolleta de API CitNa 0.85% Médium (2mL) o utilice un tubo que contenga un mL de solución salina 0.85% sin aditivo.
- Con ayuda de una asa bacteriológica tomar de 1 a 4 colonias de idéntica morfología. Se recomienda usar cultivos jóvenes (18-24 horas)
- Realizar una suspensión de turbidez igual a 0.5 mL de Mc-Farland, esta suspensión debe ser utilizada de inmediato después de haberse preparado. Foto 6

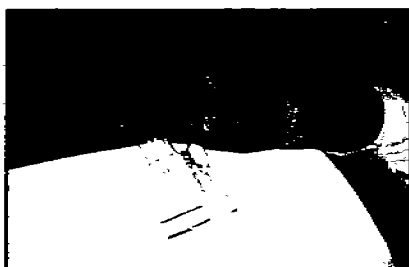


Foto 6: Comparación con 0.5 de Mc-Farland

API 50 CHB Médium

- Abrir un tubo que contenga un mL de agua fisiológica estéril
- Tomar todas las bacterias del cultivo, con ayuda de las perlas de vidrio y realice una suspensión densa en el tubo.
- Abrir una ampolleta de NaCl 0.85% Médium (5 mL) y realizar una suspensión de turbidez igual al 2 de Mc-Farland, transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión densa; anotar el número de gotas (n).
- Inocular una ampolleta de API 50 CH Médium transfiriendo la suspensión bacteriana a razón de 2 veces el número de gotas encontradas (2n). Foto 7



Foto 7: Inoculación del medio .

API STAPH

- Abrir una ampolleta de API Staph Médium
- Preparar una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 de Mc-Farland. Se recomienda utilizar cultivos jóvenes (18-24 horas).
- Esta suspensión debe utilizarse inmediatamente después de su preparación.

API 20 STREP

- Abrir una ampolleta de API suspensión Médium o bien utilizar un tubo que contenga 2 mL de agua destilada sin aditivo
- Con ayuda de perlas de vidrio estériles, retirar todo el cultivo previamente preparado.
- Realizar una suspensión muy densa; turbidez superior a 4 de Mc-Farland.

- Esta suspensión debe ser utilizada de inmediato después de su preparación.

API 20 C AUX.

- Abrir una ampolleta de NaCl 0.85% Médium
- Realizar una suspensión de levaduras de turbidez igual a 2 de Mc-Fartand. Para ello, retirar una fracción de colonia mediante una pipeta, por aspiración o toques sucesivos.
- Transferir a una ampolleta de C Médium de 2 a 4 gotas de solución anterior.

4. Inoculación de la Galería

API 20 E

- Llenar los microtubos y las cúpulas de los ensayos CIT, VP y Gel con la suspensión bacteriana utilizando una jeringa estéril de 3 a 5 ml. Foto 8



Foto 8: Inoculación de la galería

- Llenar únicamente los tubos (y no las cúpulas) de los otros ensayos.
- Debe crear una anaerobiosis en los ensayos: ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, llenando su cúpula de aceite de parafina.
- Cerrar la cámara de incubación
- Incubar a 36°C ± 2 °C durante 18-24 horas.

API 20 NE

- Rellenar los tubos (y no las cúpulas) de los ensayos desde el NO_3 , el PNPG con la suspensión sobrante. Para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, colocar la punta de la pipeta sobre el lateral de la cúpula, inclinar ligeramente la cámara de incubación hacia delante.
- Abrir una ampolleta de API AUX Médium y transferir a ella unos 200 μL de la suspensión precedente. Homogenizar evitando la formación de burbujas.
- Rellenar los tubos y las cúpulas de los ensayos desde el GLU al PAC teniendo cuidado de que se cree un mecanismo horizontal o ligeramente convexo pero jamás cóncavo.
- Las cúpulas que se hayan llenado de forma incompleta o excesiva pueden producir resultados incorrectos
- Rellenar con aceite de parafina las cúpulas de los tres ensayos subrayados (GLU, ADH, URE), para formar un menisco convexo. Foto 9



Foto 9: Uso de aceite para algunas cúpulas

- Cerrar la cámara de incubación e incube a $29^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas (± 2 horas).

API 50 CHB/E

- Repartir API 50 CHB/E Médium inocular únicamente en los tubos

NOTA: La adición de aceite de parafina es opcional; sin embargo se recomienda para las bacterias anaerobias estrictas.

Inocular únicamente los primeros 12 tests de la galería API 20 E, los 8 últimos se realizan en la galería API 50 CH, la GLU inocular para revelar la reacción NIT.

API STAPH

- Con ayuda de una jeringa estéril de 3 o 5 mL rellenar la galería con la suspensión del inóculo. Inocular solamente los microtubulos y no las cúpulas, sin sobrepasar el nivel del tubo, para evitar la formación de burbujas, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.
- Proporcionar un medio de anaerobiosis en los test ADH y URE adicionar a la cúpula con aceite de parafina para provocar un menisco convexo.
- Cerrar la cámara de incubación
- Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas.

API 20 STREP

- En la primera mitad de la galería (desde el ensayo VP al ADH), inocular la suspensión anterior, evitar la formación de burbujas (para ello inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta sobre el lateral de la cúpula), para los ensayos de VP al LAP agregar aproximadamente 100 μL en cada cúpula. Para el ensayo de ADH llenar únicamente el tubo.
- En la segunda mitad de la galería (desde el ensayo RIB al GLYG), abrir una ampolleta de API GP Médium y transferir allí el resto de la suspensión, es decir aproximadamente 0.5 mL como mínimo. Homogenizar bien. Repartir esta nueva suspensión sólo en los tubos.
- Llenar las cúpulas de las pruebas subrayadas desde la ADH a la GLYG con aceite de parafina, provocando un menisco convexo.
- Cerrar la cámara de incubación
- Incubar $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis durante 4-4.5 horas para una primera lectura y 24 horas ($\pm 2^{\circ}\text{C}$ horas), si fuera necesario para una segunda lectura.

API 20 C AUX

- Llenar las cúpulas con la suspensión obtenida en C Médium. Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de la cúpula. Cuidar de crear un nivel horizontal o ligeramente convexo, pero jamás cóncavo. Las cúpulas incompletas o demasiado llenas o demasiado vacías pueden generar resultados incorrectos.

- Cerrar la cámara de incubación e incubar durante 48-72 horas a 30°C.

LECTURA DE LAS GALERIAS

La foto 10 muestra la lectura de las galerías, escribiendo resultados en la hoja de perfil numérico ó de resultados.



Foto 10: Lectura de las galerías

Hoja de perfil numérico.

Se coloca la referencia del organismo a identificar

CE 51 955 →

Opal 20 E

Organ / Source / Herkunft /
Organ / Organ / Rijn/Koort /
Ursprung / Opiszale / Pochodzenie

HERCULES

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400

Puentes tests / Cibos tests / Andros Tests /
Otras pruebas / Other tests / Outros testes /
Alder, Echinoc / Andros tests /
Archie tests / Irvia tests:

Date / Fecha:

Se revisa la galería y en base a los resultados por prueba se determina en cada una si es +, - ó 0

API 20 E

- Después de la incubación, la lectura de la galería debe hacerse remitiéndose a la tabla de lectura.
- En caso de que 3 o más ensayos (test GLU + ó -), resultarán positivos se anotan en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y después se realizan los ensayos que necesitan la adición de reactivos:

Prueba TDA: agregar una gota del reactivo TDA, un color marrón-rojizo indica una reacción positiva y anotar en la hoja de resultados.

Prueba IND: agregar una gota de reactivo de JAMES, un color rosado que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva, que se debe anotar en la hoja de resultados

Prueba VP: agregar una gota de los reactivos VP 1 y VP 2, esperar un mínimo de 10 minutos, un color rosa o rojo indica una reacción positiva que se anotará en la hoja de resultados. Una débil coloración rosa que aparece después de 10 minutos debe ser considerada como negativa.

NOTA: La prueba de investigación sobre la producción de indol debe ser realizada en último lugar, pues esta reacción libera gases que pueden alterar la interpretación de las otras pruebas de la galería. No vuelva a colocar la tapa de la galería después de agregar el reactivo.

- Si el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos (incluyendo el ensayo GLU), es inferior a 3:

Volver a incubar la galería 24 horas (\pm 2 °C horas).

API 20 NE

- Después de la incubación, la lectura de la galería debe realizarse con relación a la tabla de identificación.
- Anotar en la hoja de resultados las reacciones espontáneas (GLU, ADH, URE, ESC GEL, PNPG).
- El revelado de los dos ensayos de NO₃ y TRP debe realizarse poniendo los ensayos de asimilación al abrigo de una contaminación aérea; para ello, coloque la tapa de la cámara de incubación sobre estos ensayos NO₃ y TRP.

Ensayo de NO₃ :

-Añadir una gota del reactivo NIT 1 y NIT 2 en la cúpula NO₃.

-Pasados 5 minutos la aparición de un color rojo nos indicará una reacción positiva, que se anotará en la hoja de resultados.

-Una reacción negativa puede deberse a la producción de Nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de microburbujas); añada 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula de NO₃ transcurridos 5 minutos, una cúpula incolora nos indica una reacción positiva que anotaremos en la hoja de resultados. Si la cúpula adquiere un color rosa-rojo, la reacción es negativa pues los nitratos aún presentes en el tubo se han reducido entonces a nitritos por la reacción del Zinc.

Ensayo TRP:

-Añadir un agota de reactivo de JAMES, la difusión en toda la cúpula debe mostrar un color rosa que nos indica una reacción positiva.

Ensayo de asimilación :

-Observe el crecimiento bacteriano, una cúpula turbia nos indica una reacción positiva.

API 50 CHB

Realizar dos lecturas de resultados:

- Para las especies termófilas a las 36 horas y las 24 horas de incubación
- Para las otras especies a las 24 horas y las 48 horas de incubación

Para la galería API 50 CH:

- En cada tubo se estudia la acidificación producida que se traduce por el vire de rojo a amarillo del rojo de fenol contenido en el medio.

NOTA. Si durante la segunda lectura, una prueba inicialmente positiva se vuelve negativa, se tendrá en cuenta únicamente el resultado positivo (se trata de una alcalinización debida a la producción de amoníaco a partir de peptona).

Para la galería API 20 E:

- El añadido de los reactivos de la galería API 20 E se efectúa en el momento de la última lectura

- Para la lectura de las pruebas, conviene referirse a la ficha técnica API 20 E, deben registrarse los resultados de las 11 primeras pruebas y de la reacción NIT en la prueba GLU para la interpretación final.

API STAPH

Después de la incubación se consiguen las reacciones al agregar una gota de cada uno de los reactivos y a continuación se interpretan conforme a la tabla de identificación:

Prueba VP: Reactivos VP1 y VP2, espere 10 minutos si el color es violeta-rosáceo indica una reacción positiva, un color rosa pálido o rosa claro obtenido después de 10 minutos debe ser considerado como negativo.

Prueba NIT: Reactivos NIT 1 y NIT2, espere 10 minutos, un color rojo indica una reacción positiva.

Prueba PAL: Reactivos ZYM A y ZYM B, espere 10 minutos, un color violeta indica una reacción positiva.

API C AUX

Después de 48 ó 72 horas de incubación (si las pruebas, en particular la glucosa no son suficientemente evidentes después de 48 horas), observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva, que debe anotarse en la hoja de resultados. Con el fin de evitar cualquier contaminación por reincubación, retire la tapa solo durante el periodo de lectura.

API STREP

Después de 4 horas de incubación

- Añadir los reactivos
 - Ensayo VP: UNA GOTTA DE VP1 y VP2
 - Ensayo HIP: 2 gotas de NIN
 - Ensayo PYRA, α GAL, β GAL, PAL, LAP, una gota de ZYMA y ZYM B

- Espere 10 minutos para leer todas las reacciones, remitiéndose la tabla de identificación, si es necesario, exponer la galería a una lámpara de luz intensa 10 segundos para eliminar el exceso de reactivo de los tubos desde el PYRA al LAP.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

- En la hoja de resultados, los ensayos se separan en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1, 2 ó 4. Sumar en el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico.
- Por medio del software de identificación, introducir manualmente por teclado el perfil numérico de 7 cifras.

La identificación de un microorganismo se acompaña de la siguiente información:

- El porcentaje de identificación, que se estima la proximidad relativa del perfil observado a los diferentes taxones de la base de los datos de la galería
- El índice T, que expresa la proximidad del perfil observado al perfil más típico en cada taxón.
- El comentario sobre la calidad de la identificación, que toma en cuenta el porcentaje de identificación (o la suma de los % id) y el índice T (o la media de los índices T).

EXCELENTE IDENTIFICACIÓN % id > 99.9 y T > 0.75

MUY BUENA IDENTIFICACIÓN % id > 99.9 y T > 0.5

BUENA IDENTIFICACIÓN % id > 99.9 y T > 0.25

IDENTIFICACIÓN ACEPTABLE % id > 80.0 y T > 0

CRITERIO DE ACEPTACION

El siguiente procedimiento es aceptado si:

- Se cumplieron los puntos antes mencionados.
- Si las galerías y reactivos empleados están vigentes.

LISTA DE DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad
1. Personal químico y técnico de microbiología

REFERENCIAS

Especificaciones del proveedor del API, BIOMERIEUX

ANEXO I. GLOSARIO

API 20 E: Sistema de identificación de Enterobacterias y otros bacilos Gram- negativos.

API 20 NE: Sistema de identificación de bacilos Gram-negativos no entéricos, oxidasa positiva.

API STAPH: Sistema de identificación de Staphylococcus, micrococcus y géneros relacionados.

API STREEP: Sistema de identificación de los Streptococcus y otros relacionados.

API 20 CAUX: Sistema de identificación de levaduras

API 50 CHB: Sistema de identificación del género *Bacillus* y de *Enterobacterias*.

INOCULO: Suspensión de microorganismo

C MÉDIUM: Medios de suspensión para microorganismos del género *Candida*

GP MÉDIUM: Medio de suspensión para *Streptococcus*

API STAPH MÉDIUM: Medio de suspensión para *Staphylococcus*.

API 50 CH MÉDIUM: Medio de suspensión para bacilos Gram positivos.

API SUSPENSION MÉDIUM: Medio de suspensión para diversos géneros de microorganismos.

CitNa MÉDIUM: Medio de suspensión de microorganismos no entéricos a base de Citrato de Sodio.

DIFUMINA: Se entiende como dispersión de un color durante una reacción.

TERMOFILAS: Microorganismos que crecen a temperaturas elevadas.

VIRE: Cambio de color originado por modificación del pH de una solución

1.5.6 PROCEDIMIENTO DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO LAL

El propósito de esta prueba es realizar controles de calidad a los reactivos adquiridos para garantizar que éstos al emplearse proporcionen resultados confiables, según las especificaciones.

I- MATERIAL Y EQUIPO.

- 1.- Tubos de ensayo libres de pirógenos
- 2.- Test LAL (Reactivo limulus, endotoxina)
- 3.- Gradilla
- 4.- Jeringas de insulina (1mL) estériles
- 5.- Vortex
- 6.- Mechero
- 7.- Agua libre de pirógenos
- 8.- Alcohol al 70%
- 9.- Incubadora $35^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$

II.- PROCEDIMIENTO.

El test LAL esta constituido por:

- REACTIVO LAL
- ENDOTOXINA BACTERIANA
- AGUA LIBRE DE PIROGENOS

Para evaluar la sensibilidad del reactivo se procede de la siguiente forma:

1. Sanitizar perfectamente el área de trabajo
2. Encender el mechero.
3. Rotular 20 tubos apirogénicos, 4 para cada dilución, considerando las diluciones 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 UE/mL, para construir la curva. Foto 1



Foto 1: tubos rotulados para la curva de sensibilidad

4. Reconstituir el reactivo LAL de la siguiente forma:

- Tomar un frasco de agua libre de pirógenos, quitar la tapa metálica cuidadosamente y con la ayuda de un algodón impregnado con alcohol al 70% limpiar la parte superior y esterilizar a la flama, repetir lo mismo con el frasco de reactivo de LAL.
- Homogenizar con movimientos suaves, no agitar y evitar la formación de espuma.

5. Reconstituir el control estándar de endotoxina de la siguiente manera:

- Esterilizar a la flama un frasco de agua libre de pirógenos, así como el frasco de control estándar de endotoxina.
- Agregar la cantidad de agua pirógenos indicada en el certificado del proveedor.
- Agitar vigorosamente sin interrupción en un agitador tipo vortex durante 30 minutos.



Foto 2: agitación al vortex de la endotoxina

- La solución concentrada debe mantener una temperatura de 20-25 °C y agite durante tres minutos antes de usarse en el vortex.
- Agitar cada dilución por lo menos antes de usarse en el vortex.
- Realizar al control estándar de endotoxina con concentración de 2000 UE/mL una dilución 1:2 y se continua con las diluciones para obtener una concentración de 1000 UE/mL de esta tomar 1 mL y llevar a un volumen de 10 mL para tener una concentración de 10 UE/mL a partir de esta última solución realice las diluciones indicadas en la Tabla

TABLA DE DILUCIONES PARA LA CURVA

# Tubo	Dilución	Concentración
1	1:10	1 UE/mL
2	1:2	0.5 UE/mL
3	1:2	0.25 UE/mL
4	1:2	0.125 UE/mL
5	1:2	0.0625 UE/mL
6	1:2	0.03125 UE/mL

UE: Unidades de Endotoxina

6. Colocar 0.1 mL de cada una de las diluciones en los cuatro tubos apirogénicos correspondientes.
7. A cada uno de los tubos adicionar 0.1 mL de reactivo de LAL, con ayuda de una jeringa apirogénica.
8. Preparar dos controles negativos de la siguiente manera:
 - A dos tubos apirogénicos adicionar 0.1 ml de agua apirogénica y 0.1 mL de reactivo LAL
9. Incubar todos los tubos a 37 °C ± 1 °C durante 60 ± 2 °C minutos, evitar vibraciones y mantener en reposo absoluto durante el tiempo de análisis.

NOTA: Todo el material que emplee la prueba, debe estar libre de pirógenos, para el material de vidrio, utilizar ciclos de esterilización, despirogenización con calor seco a temperatura de al menos 250°C o a la temperatura y tiempo establecidos por las condiciones de validación.

III. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Al finalizar la incubación, tome cada uno de los tubos e inviértalos con cuidado 180°
- 1.2 Un resultado positivo, se caracteriza por la formación de un gel firme adherido al fondo del tubo, que mantiene su integridad cuando se invierte el tubo Foto 3.

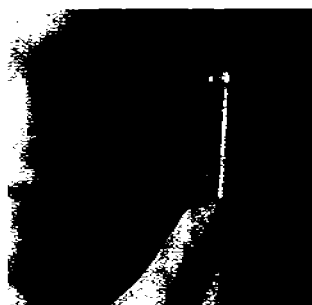


Foto 3: Resultado positivo

- 1.3 Un resultado negativo, se caracteriza por la ausencia de un gel firme o por la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad al invertir el tubo.
- 1.4 Tabule los datos de la siguiente forma:

CONCENTRACIONES (UE/ml)						
PRUEBA						PUNTO FINAL
A	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	
1						
2						
3						
4						

- 1.4.1 Indicar la reacción positiva por cada prueba, en el espacio correspondiente.
- 1.4.2 El punto final para cada serie será la concentración más baja que muestre un resultado positivo.
- 1.5 Calcular la media geométrica del punto final de la siguiente manera:

- 1.5.1 Obtenga el logaritmo base 10 de cada uno de los puntos finales
- 1.5.2 Calcule la media aritmética, sumando los cuatro resultados y dividiéndolos entre cuatro.
- 1.5.3 Calcule el antilogaritmo de la media aritmética, este valor corresponde a la sensibilidad del reactivo LAL en UE/mL.

IV. CRITERIO DE ACEPTACIÓN

1. El lote adquirido se aprueba si la sensibilidad obtenida es menor o igual a la sensibilidad reportada en el certificado del proveedor.
2. El lote se rechaza si la sensibilidad es mayor a la reportada en el certificado del proveedor.

V. REFERENCIAS

1. USP 26.NF 21, 2003. Pág 2023-2025
2. FEUM 7ª ED. 2000. TOMO I Pág. 257-260
3. Especificaciones del proveedor

VII ANEXO. FORMATO DE REPORTE

Lote del reactivo LAL: _____ Fecha de análisis inicial: _____
 Fecha de Caducidad: _____ Lote de estándar de endotoxina: _____
 Fecha de análisis: _____

RESULTADOS						
CONCENTRACIONES (UE/ml)						
PRUEBA	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	PUNTO FINAL
1						
2						
3						
4						

TESTIGO NEGATIVO: _____

CALCULOS:

Punto Final Log₁₀ Punto Final
 _____ _____
 x = _____

1.5.7 PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DE SEGURIDAD

Con el fin de asegurar que ningún envase primario para la fabricación de parenterales podría causar toxicidad se lleva a cabo dicha prueba.

I- MATERIAL Y EQUIPO.

Ratones Blancos de una sola cepa.

Jaulas para ratones.

Jeringas estériles y apirogénicas con aguja calibre 25 mm x 16 mm de longitud

Solución Salina estéril.

Balanza granataria.

Frascos apirogénicos.

Algodón.

Alcohol al 70%.

Mechero.

Incubadora $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Contenedor para ratones.

II.- PROCEDIMIENTO.

1. Identificar a los ratones que va a utilizar (5 ratones por prueba).

2. Preparar en el laboratorio las soluciones:

2.1. Jeringa Estéril.

- Tomar 10 jeringas y sacarlas de su envoltura cerca del mechero.
- Esterilizar a la flama la tapa del frasco que contiene la solución salina estéril.
- Realizar por lo menos 2 enjuagues con la solución salina estéril a cada una de las jeringas y transferir el contenido en un frasco apirogénico identificado.
- Dosificar con el volumen a administrar (0.5 ml.) a cada uno de los ratones en una jeringa de 25 mm x 16 mm de longitud (insulina).

2.2. Ampolletas Estéril.

- Tomar 10 ampolletas y con una gasa impregnada con alcohol al 70% sanitice
- Con un rompe ampolletas, abrirlas cerca al mechero.

- Esterilizar a la flama la tapa del frasco que contiene la solución salina estéril y tomar el volumen requerido según la capacidad de la ampolla.
 - Vaciar el contenido de la solución salina estéril por las paredes de la ampolla y enjuagar por lo menos 2 veces.
 - Realizar lo mismo para cada ampolla a analizar.
 - Tomar de cada ampolla un volumen aproximado 0.2 ml.
3. Colocar las jeringas que contienen la solución en la incubadora de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos; las jeringas contienen el volumen requerido para la administración, cuidando de no dejar burbujas.
 4. Tomar a cada uno de los ratones sujetándolos por la cola cerca del cuerpo.
 5. Colocar al animal dentro del contenedor para ratones, cerrar el contenedor quedando la cola del animal fuera de este.
 6. Localizar una vena caudal lateral y limpiar con alcohol al 70%
 7. Tomar la jeringa con la solución a administrar e inocular al ratón a una velocidad de 0.1 ml por segundo.
 8. Observar a los animales a las 24 y 48 horas.
 9. Anotar la mortalidad y signos anormales a las 24 y 48 horas.

III. CRITERIO DE ACEPTACIÓN.

1. La prueba de seguridad cumple sí:

- 1.1. Al observar los ratones durante 24 y 48 horas todos sobreviven.
- 1.2. Al observar los ratones durante 24 y 48 horas ninguno presenta signos anormales.

Si uno ó más ratones mueren, repetir la prueba usando diez ratones más.

2. La prueba de seguridad para la repetición cumple sí:

- 2.1. El número total de ratones muertos no excede del 10 por ciento del total de ratones utilizados.

IV. REFERENCIA.

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 7ª Edición, Págs. 346 - 347.

1.5.8 PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJO

Esta prueba se basa en el registro del aumento de temperatura en el conejo, como respuesta a la presencia de agentes pirogénicos, principalmente endotoxinas, puesto que la reacción fisiológica del conejo a estos últimos es similar a la del hombre.

I. EQUIPO Y MATERIAL

1. Conejos del mismo sexo, sanos con un peso no menor a 1.5 Kg
2. Termómetros clínicos calibrados (escala de 35°C a 45 °C), la escala debe ser de 0.1°C y alcanzar la máxima lectura en menos de 5 minutos.
3. Jeringas estériles y libres de pirógenos (de 0.1 mL, 5 mL y 10 mL).
4. Frascos apirogénicos
5. Aguja de insulina estériles y libres de pirógenos
6. Báscula
7. Cepos
8. Algodón
9. Alcohol al 70%
10. Glicerina
11. Mechero
12. Incubadora 37°C \pm 2°C

II. PROCEDIMIENTO

1. De acuerdo al histórico de pruebas, identifique a los conejos que va a utilizar (3 conejos por prueba).
2. Tomar a cada uno de los conejos por el lomo, depositarlo en la báscula y registrar su peso.
3. Colocar a cada animal en los cepos. Foto 1

Foto 1: conejos en cepos



4. Verificar que el termómetro clínico, este en buenas, el mercurio debe estar por debajo de 35°C , sumergir el bulbo del termómetro en la glicerina.
5. Sostener con la mano el termómetro y con la otra mano sujetar y levantar al conejo, con movimientos suaves introducir el termómetro en el recto del conejo hasta apreciar que el mercurio comienza a desplazarse, a partir de este momento contabilizar un minuto para realizar la primera lectura.

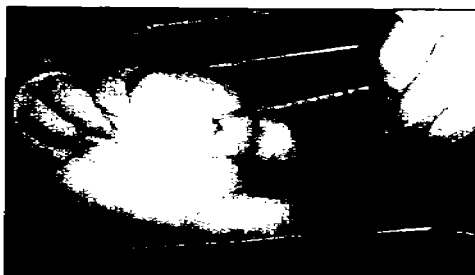


Foto 2: toma de temperatura

6. Determinar la temperatura testigo de cada animal, tomar lecturas cada 30 minutos, hasta que la variación no sea mayor de 0.2°C , la última es la lectura testigo.
7. Preparar en el laboratorio las soluciones a aplicar de acuerdo al peso del animal.
8. Colocar las jeringas que contienen la solución en la incubadora de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos; las jeringas contienen el volumen requerido para la administración de cada conejo, cuidando de no dejar burbujas y cambiar la aguja por una aguja de menor calibre.
9. Tomar la oreja del animal, localizar la vena marginal y limpiar con alcohol al 70%. Foto 3.



Foto 3: localización de la vena

10. Con la mano izquierda sujetar la oreja del conejo de manera que no se vaya a resbalar, con la otra mano tomar la jeringa y formar un ángulo de aproximadamente 45° con respecto a la oreja del conejo, colocar la aguja con el biseñ hacia arriba.



Foto 4: Inoculación de la vena

11. Desplazar el embolo lentamente pero de forma continua hasta terminar de aplicar la solución (efectuar la inoculación dentro de los 30 minutos a la lectura de la temperatura testigo).

11. Una vez finalizada la administración, tomar la temperatura de los animales a la primera hora, segunda y tercera horas después de la inyección.

III. CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La prueba de pirógenos cumple sí:

- A) Ningún conejo muestra un incremento individual de 0.6°C o más sobre su temperatura testigo respectiva.
- B) Si la suma del incremento mayor de los tres conejos no excede de 1.4°C, la muestra cumple con los requisitos.
- C) Si uno o dos animales muestran un aumento de temperatura de 0.6°C o más, o si la suma del incremento mayor de los tres conejos excede de 1.4°C, repetir la prueba usando 5 conejos o más.

La prueba de pirógenos para la repetición cumple sí:

- A) No más de tres de los ocho conejos muestran una elevación de temperatura de 0.6°C o más.
- B) La suma de los incrementos mayores de los ocho conejos no es superior a 3.7°C

IV. REFERENCIAS CONSULTADAS

FEUM 7ª edición (2000) Pág. 334-33

I. ANEXO 1 FORMATO DE REPORTE

Producto: _____ Dosis Administrada: _____
 No. Lote: _____ Volumen: _____
 No. De Control: _____ Fecha de la Prueba: _____ Lote de Conejo: _____

RESULTADOS

ANTES DE INOCULAR:

No. De Conejo	PESO (KG)	HORA: TEMPERATURA (°C)	HORA: TEMPERATURA	HORA: TEMPERATURA	DOSIS (mg/dl)

DESPUÉS DE INOCULAR:

No. De Conejo	PESO (KG)	HORA: TEMPERATURA (°C)	HORA: TEMPERATURA (°C)	HORA: TEMPERATURA (°C)

TOTAL DE INCREMENTOS: _____ DICTAMEN: _____

OBSERVACIONES: _____

Especificaciones. Ningún incremento individual excede 0.6°C, ni la suma de los incrementos mayores excede 1.4°C, cuando la prueba es inicial y se emplean 3 conejos. Cuando la prueba se repita empleando 5 conejos, no más de 3 (total 8) tienen un incremento mayor ó igual a 0.6°C, ni la suma de los incrementos mayores de los 8 conejos excede 3.7°C.

1.5.9 PROCEDIMIENTO DE LA EVALUACIÓN DE SANITIZANTES

La eficacia de un sanitizante esta dada por su capacidad para destruir o matar una carga microbiana presente en el agua. Esta eficacia esta basada en su poder bactericida a través de sus componentes químicos y su efecto sobre las bacterias de acuerdo con su concentración y tiempo de contacto.

Ningún agente químico antimicrobiano es el mejor o el ideal para uno o todos los propósitos existen diferencias en sus mecanismos de acción y muchos tipos de células microbianas que pueden ser destruidas. No obstante existen una serie de características que debe tener un buen sanitizante y son las siguientes: actividad antimicrobiana, solubilidad, estabilidad, no deberá ser tóxico, homogeneidad, no deberá reaccionar con material orgánico extraño, tener capacidad de penetración y capacidad detergente.

I. MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL

1. Matraz aforado de 100 mL.
2. Jeringa estéril de 3 mL.
3. Frascos estériles
4. Tubos de ensaye de 20 x 150 mm estériles
5. Mechero
6. Asa bacteriológica
7. Pipeta volumétrica de 5 mL.
8. Perlas de vidrio estériles
9. Micropipeta

EQUIPO

1. Incubadora temperatura $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
2. Incubadora temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
3. Espectrofotómetro
4. Vortex

REACTIVOS

1. Diez tubos de ensaye de 20 x 150 mm con 9 ml de solución buffer de fosfatos pH7.2
2. Agar Lethen

3. Agar de Soya Trypticaseína (AST)

4. Agar Dextrosa Saboraud (ADS)

II. PROCEDIMIENTO

A) PREPARACIÓN DEL INOCULO

1. Antes de realizar la prueba de actividad antimicrobiana, resemar los siguientes microorganismos por estria cerrada en cajas petri con medio de agar soya tripticaseína o tubos de agar dextrosa Saboraud según aplique.

A. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

B. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

C. *Escherichia coli* ATCC10536

D. *Bacillus subtilis* ATCC6633

E. *Salmonella typhimorium* ATCC6539

F. *Aspergillus niger* ATCC16404

G. *Candida albicans* ATCC6539

H. Microbiotas de cada laboratorio en específico

2. Incube AST temperatura $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas

3. Incube ADP a temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 días

4. Una vez concluidos los tiempos de incubación, remueva el crecimiento de cada tubo, con 3 ml de solución salina isotónica o buffer de fosfatos pH 7.2, auxiliándose con perlas de vidrio estériles.

5. Transfiera el sobrenadante a un frasco estéril, identifique cada frasco con los siguientes datos:

- Nombre del microorganismo.
- Tipificación.
- Fecha.
- Analista.

6. Determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias UFC/mL y precise el porcentaje de transmitancia de una suspensión que contenga de 75 a 125×10^8 UFC/mL y considerar este valor de transmitancia para análisis futuros.

B) DETERMINACIÓN DE LA CUENTA VIABLE INICIAL.

1. A un tubo de ensaye que contenga 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, transferir un mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectúa diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan entre 25 y 250 colonias.

2. Colocar un mL de cada una de las diluciones en cajas Petri, agregue de 15 a 18 mL de agar Lethen, homogenizar y deje solidificar, invertir las placas e incubar 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Después del periodo de incubación, cuente las colonias de las placas.

c) PREPARACIÓN DE LA SERIE SANITIZANTE

1. Preparar las diluciones de cada sanitizante de acuerdo a la concentración recomendada por el fabricante y transferir 9 mL de esta solución en tubos con capacidad de 15 mL (utilizar para su preparación agua desionizada).

2. Inocular cada tubo con 1 mL de microorganismo previamente ajustado a la transmitancia que contiene de 75 a 125×10^8 UFC/mL

Agitar perfectamente con ayuda de un vortex

3. A partir del contacto con el sanitizante tomar el tiempo con un cronómetro y dejar actuar durante 5 minutos, este paso debe realizarlo con la mayor exactitud posible.

4. Transcurridos los 5 minutos tomar 1 mL de esta suspensión y colocar en el tubo que contiene 9 mL de caldo neutralizante previamente preparado.

5. Después de detener la acción del sanitizante, hacer diluciones decimales, partiendo de la solución realizada en el punto 3.4. Realizar las diluciones en buffer de fosfatos 7.2 o bien en solución salina estéril al 0.85%

6. Agitar perfectamente con el vortex entre dilución y dilución.

La décima dilución corresponde al tubo que contiene la solución neutralizante.

7. Sembrar 1 mL de cada solución en cajas Petri perfectamente rotuladas con los siguientes datos:

- ✓ Microorganismos de prueba
- ✓ Sanitizante empleado
- ✓ Concentración
- ✓ Dilución correspondiente
- ✓ Fecha de inicio de análisis

8. Agregar 20 mL de agar Lethen a cada una de las placas y deje solidificar.

9. Incubar durante 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para el caso de bacterias, y de 2 a 5 días a $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, para hongos filamentosos y levaduras

10.-Comparar con respecto al control.

E) PREPARACIÓN DE TESTIGOS NEGATIVOS

1. Vertir en 4 cajas Petri aproximadamente 20 mL de agar Lethcen, empleando para el análisis e incubar 2 de ellas a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y el resto de las cajas a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
2. Transferir el contenido de 4 tubos del buffer empleado en la prueba a cajas Petri y agregar 20 mL aproximadamente de agar Lethcen, e incubar 2 de ellas a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para mesófilos y 2 cajas a una temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para hongos.

III. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Realizar el conteo de UFC de todas las placas tanto en la serie control, como en la serie sanitizante.

- a) Calcular el porcentaje de reducción

$$\% \text{ de reducción} = 100 - S \times (100/\text{CV})$$

Donde: S= Células sobrevivientes UFC/ml

C.V.=Cuenta viable inicial

2. Efecto del sanitizante

- e) Del número obtenido de UFC de la C.V. y las sobrevivientes, determinar el logaritmo y aplicar la siguiente formula:

$$\text{Efecto sanitizante} = \log \text{C.V.} - \log \text{S}$$

Donde:

C.V.= Cuenta viable inicial

S= Es el número de unidades formadoras de colonias sobrevivientes.

4. Los testigos no deben presentar crecimiento alguno.

IV CRITERIO DE ACEPTACIÓN

El procedimiento cumple si se sigue correctamente cada uno de los puntos anteriormente descritos.

V. REFERENCIAS

1. Instituto Mexicano del Seguro Social. Norma Métodos Generales de Análisis. Determinación de la actividad antimicrobiana. 11 Diciembre 1996.

VII. ANEXO "FORMATO DE REPORTE DE SANITIZANTE"

Producto: _____ Número de Control: _____

Lote de Proveedor: _____ Fecha de análisis inicial: _____

Concentración: _____ Fecha de análisis final: _____

MICROORGANISMO	% TRANSMITANCIA	CUENTA CONTROL UFC/ml	RESULTADO UFC/ml	%REDUCCION
----------------	-----------------	--------------------------	---------------------	------------

_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

DICTAMEN _____

OBSERVACIONES: _____

1.5.10 VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA

La potencia de los antibióticos se determina comparando la dosis a la cual se inhibe el crecimiento de un microorganismo adecuado y susceptible, con la dosis de la preparación el antibiótico de referencia en las mismas condiciones de trabajo.

La valoración de antibióticos puede efectuarse por métodos químicos o microbiológicos. Un método químico no revela una reducción en la actividad microbiana. El método aquí explicado será el de cilindro-placa o de difusión, según FEUM, CIPAM, USP.

En este método se emplean placas con agar inoculado y cilindros de acero inoxidable que permita la difusión del producto y que después de un periodo de incubación presente zonas claras de inhibición cuantificables en milímetros.

La zona de inhibición se forma usando se alcanza la concentración crítica del fármaco. El tamaño de la zona se determina por la distancia que la concentración crítica del antibiótico puede difundir dentro del medio de agar antes de que se alcance una densidad determinada de microorganismos. Esta zona de inhibición se completa dentro de las primeras horas e incubación, pero para hacerse visible se requiere que transcurra un tiempo mayor que depende de las cinéticas de inhibición y crecimiento del microorganismo de prueba en presencia e la concentración del antibiótico. Para efectuar estas pruebas se requiere personal con experiencia que uniformice cada paso y estandarice la prueba.

REACTIVOS

- Sustancias de referencia. Deben ser certificadas y es necesario conservarlas y manejarlas adecuadamente, ya que los resultados analíticos se obtienen por comparación respecto ellas y cualquier alteración que sufran se refleja en los valores obtenidos.
- Organismo indicador (Cepa Tipo. Aunque para cada antibiótico pueden emplearse diversas cepas tipo, es recomendable emplear la indicada oficialmente, ya que está avalada por estudios comparativos y evaluados. Se recomiendan cultivos recientes de 24 horas, excepto para la obtención de esporas).

- Muestra. La cantidad de muestra a analizar, debe ser representativa y similar para cada ocasión en que se analice un mismo fármaco o presentación farmacéutica.
- Medio de cultivo. Para la capa base y la capa siembra. Existen ya medios de cultivo preparados especiales para valoración de antibióticos.
- Cajas Petri de vidrio estériles
- Tapas de porcelana porosa
- Pipetas volumétricas
- Micropipeta
- Matraces aforados
- Incubadora

METODOLOGÍA

1. Profundidad de la capa base y la capa siembra de agar. Las capas deben aplicarse en una superficie nivelada para tener una solidificación uniforme del agar. Deben utilizarse los volúmenes recomendados en la literatura oficial, ya que éstos están en relación directa con la velocidad de difusión del fármaco.

Las moléculas de mayor peso molecular tardan más en difundir y por consiguiente requieren de menor volumen de agar.

Tomar en cuenta que para cada punto de la línea dosis-respuesta se prepararan 3 placas al igual que para la muestra problema.

2. Estandarización del inóculo. La suspensión microbiana debe cosecharse en el mismo tipo de frascos o tubos y recolectarse con igual volumen de solución salina estéril. La suspensión original debe ajustarse de tal manera, que cuando se haga la dilución recomendada en el método para cada antibiótico (ya sea 1:14, 1:20, 1:40, etc.) Se alcance el 25% de transmitancia a 580 nm. Si no se obtiene esta lectura, adicionar a la suspensión original solución salina estéril en proporción tal que al hacer nuevamente la dilución recomendada se obtenga el 25% de transmitancia.

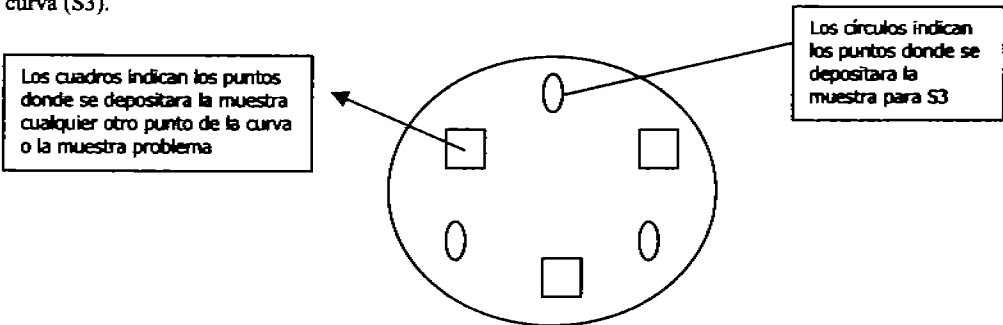
Adicionar el volumen indicado de la Suspensión Original ajustada (no la de la dilución que da el 25% de transmitancia) a cada 100 ml de medio estéril, fundido y mantenido a 48-50 grados centígrados.

3. Preparación de la línea dosis respuesta. Pesar una cantidad exacta para obtener la concentración requerida en el solvente o diluyente señalado, tomando en cuenta la pureza de éste. Prepara la línea

dosis- respuesta: S1, S2, S3, S4 y S5. Para la muestra preparar la dilución de prueba (concentración media de la línea dosis respuesta) que se especifica para cada antibiótico.

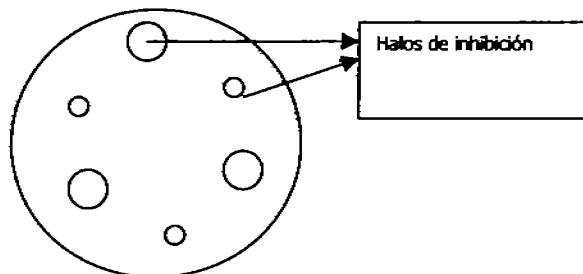
4. Penicilindros. Colocación y llenado. Para colocarlos en las placas, de preferencia debe emplearse un colocador de penicilindros. El tiempo entre el llenado del primer cilindro y el último, no debe ser mayor de 20 minutos. Tiempos más largos, afectan el tamaño de las zonas. Terminado el llenado, las placas deben cubrirse con tapas de porcelana porosa estériles, que absorban el agua de condensación. Una vez tapadas, se colocarán de inmediato en una incubadora de temperatura controlada.

De los 6 cilindros que contiene cada una de las 3 cajas, llenar alternadamente 3 de ellos con la muestra y los 3 restantes con la solución del estándar que contienen la concentración media de la curva (S3).



5. Temperatura y tiempo de incubación. Normalmente se incuban a 35°C con variantes, según el antimicrobiano y el tiempo por lo general es de 16 – 18 horas.

6. Medida del limite de zona. Es importante estandarizar la intensidad y el ángulo de luz usado para iluminar las placas cuando se van a medir las zonas, por lo que es conveniente utilizar un medidor de zonas.



7. Resultados. Obtenga los promedios de las 9 lecturas para las diferentes concentraciones. Recuerde que en cada serie de tres placas se puso una concentración de la curva tipo (S1, S2, S4, S5) junto con el punto central de la misma curva (S3).

Promediar las 36 lecturas del punto central de la curva S3. Este valor se conoce como estándar.

Obtener los puntos Alto y bajo de la curva.

Bajo: $3S1 + 2S2 + S3 - S5/5$

Alto: $3S5 + 2S4 + S3 - S1/5$

Graficar los resultados de la curva, según el procedimiento y fórmulas elegidos, en papel semilogarítmico de 2 ciclos, colocando los valores de la concentración en microgramos/ml en la escala logarítmica (ordenada) y en la abscisa, el diámetro de las zonas e inhibición en mm.

Interpolar en la curva el resultado de la muestra, para obtener la concentración por ml. Multiplicar por el factor de la dilución empleado así llegar a la concentración de la muestra.

1.6 PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

A) DOCUMENTACIÓN

Es una parte medular dentro del laboratorio de microbiología al igual que de toda la industria farmacéutica ya que es la evidencia de todas las actividades realizadas.

Podemos definir al documento del sistema de calidad como aquel que es útil para el empleo, control y demostración del sistema gerencial de calidad.

¿Cuáles son los objetivos de la documentación según las BPF de la OMS?

- Definir las especificaciones y procedimientos para todos los materiales y métodos de control.
- Garantizar que todo el personal relacionado sepa lo que tiene que hacer cuando hacerlo.
- Garantizar que existan las evidencias documentadas, trazabilidad y registros que permiten a una auditoría realizar una investigación.
- Garantizar la disponibilidad de datos necesarios para la validación, revisión y análisis estadísticos.


Las funciones de un sistema de documentación en condiciones de BPF es establecer, monitorear y documentar la calidad.

Un buen sistema de documentación garantiza que:

- Los estándares de calidad sean alcanzados rutinariamente
- Se minimicen los riesgos potenciales de error
- Se reduzcan los tiempos durante la investigación de desviaciones o fallos al proporcionar un acceso inmediato y organizado a los datos.
- Se facilite el entrenamiento de todos los trabajadores.

RASTREABILIDAD: NOM 059, es la capacidad de reconstruir la historia y localización de un elemento ó de una actividad por medio de documentos registros e identificaciones.

Estructura de un sistema de documentación es:

- 
- * Documentos Legales
 - * Documentos de Compromiso
 - * *Documentos Directivos: Procedimientos, Especificaciones y protocolos*
 - * Documentos de Recogida de Datos
 - * Documentos de trazabilidad.

Se puede definir a las Buenas prácticas de documentación como: el conjunto de actividades relacionadas que, como parte integral de las buenas prácticas de fabricación, contribuyen a lograr y mantener la calidad de los productos farmacéuticos, mediante el manejo controlado de la información y el correcto funcionamiento del sistema de documentación.

La documentación debe:

- Ser emitida y revisada por expertos del área que los elabora así como autorizada por el responsable sanitario de la empresa.

- Ser acorde con el sistema de calidad
- Estar vigente
- Ser de fácil acceso
- Ser parte de un listado maestro
- Distribuirse y controlarse adecuadamente
- Debe ser legible y escrita en el idioma local
- Cumplir con un formato establecido
- Reproducirse a través de un método que no de lugar a errores
- Difundirse y capacitarse
- Revisarse, actualizarse y perfeccionarse, dando a conocer los cambios oportunamente (esto implica auditorías)
- Conservarse el tiempo estipulado

Según la NOM-059, se debe contar con especificaciones escritas para la evaluación de cada lote de materia prima, producto a granel, material de acondicionamiento y producto terminado.

Se debe contar con PNO'S para el muestreo de materia prima, producto a granel, material de acondicionamiento y producto terminado.

Se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima, en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la farmacopea nacional.

Por todo lo antes mencionado, es importante que el laboratorio de microbiología cuente con un listado de procedimientos actualizados y que cada uno de ellos cumpla con las características que debe tener cualquier documento.

El empleo de bitácoras es importante, debe contar con una lista de éstas, en cada una de ellas debe llevar acabo los registros de las actividades realizadas, de uso de los equipos empleados en los análisis, éstas tienen que estar referidas en los diferentes procedimientos, deben ser enumeradas y con un código que las identifique de acuerdo al uso o actividad a registrar.

B) ¿Cómo definimos a un PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN (PNO) ?

Según la NOM-059 (3.37) se define como el documento que contiene las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación.

Para elaborar un procedimiento debemos considerar: el nivel del detalle, la amplitud, si es necesario o no que exista un PNO y los diagramas de flujo.

El nivel de detalle puede ser bajo, medio ó alto.

Los que requieren menos detalles: las mismas personas realizan rutinariamente las mismas tareas, se dispone de otras fuentes de información, se dispone de un buen sistema de capacitación, los formatos en las computadoras guían a los operarios.

Los que requieren más detalles: la tarea es crítica, la tarea es complicada, la tarea no se realiza frecuentemente, no se dispone de mucho tiempo para la capacitación, hay muchas personas involucradas en las tareas, no hay margen de variaciones en el procedimiento.

Es conveniente agrupar en un mismo procedimiento aquellas tareas relacionadas que son realizadas por una misma persona o equipo durante tiempo normal o consecutivo.

¿ Debe elaborarse un PROCEDIMIENTO? La respuesta es de acuerdo a las necesidades, si la tarea o actividad es importante, si hay más de una persona involucrada, si se ve afectada la tarea o proceso la seguridad, identidad, pureza o calidad del producto, si la tarea necesita ser realizada consistentemente.

ESTRUCTURA DE LOS PROCEDIMIENTOS

- 1.- ENCABEZADO
- 2.- TITULO
- 3.- OBJETIVO
- 4.- ALCANCE
- 5.- INTRODUCCIÓN (TÉRMINOS Y DEFINICIONES)
- 6.- RESPONSABILIDAD
- 7.- CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD
- 8.- EQUIPO
- 9.- MATERIALES
- 10.- REACTIVOS
- 11.- PROCEDIMIENTO
- 12.- REGISTRO DE DATOS
- 13.- REFERENCIAS
- 14.- ANEXOS

1.- EL encabezado: Debe llevar por lo menos 3 firmas

La firma de quien lo emite: Es quien origina el documento, título de la persona, nombre y puesto que desempeña

La firma de quien lo revisa: Verifica la exactitud de los datos del documento, título de la persona, nombre y puesto que desempeña

La firma de quien lo Autoriza: Confirma que el contenido sea correcto y que este conforme con las políticas, procedimientos y guías de la empresa.

Aquí vemos el ejemplo de un encabezado.

NOMBRE DE LA EMPRESA

Departamento: Control de Calidad	PROCEDIMIENTO GENERAL	Código
Título:	Título	Página Página
En vigor: FECHA DE EMISIÓN	Sustituye a: FECHA AL QUE SUSTITUYE	Próxima Revisión: FECHA DE PROXIMA REVISIÓN
Elaboró: Título y nombre Puesto que desempeña	Revisó: Título y nombre Puesto que desempeña	Aprobó: Título y nombre Puesto que desempeña

- Título: Es Obligatorio y éste debe ser corto.
- Objetivo: es obligatorio y con referente al título
- Alcance: Es obligatorio. Se debe considerar: a qué aplica, quién lo aplica, dónde se aplica, cuándo se aplica.
- Términos y definiciones: Es opcional, pero debe ser breve.
- Responsabilidades: Es obligatorio. Indica: quién controla, supervisa y lleva a cabo.
- Condiciones de seguridad: Es opcional. Incluye : agentes químicos, contaminación biológica, limpieza de derrames, etc.
- Equipo: Es opcional. Se recomienda que se indique en tablas con las características más importantes de los mismos.
- Materiales. Es opcional. Se recomienda que se indique en tablas con las características más importantes de los mismos.

- **Reactivos y preparaciones:** Es opcional. Se recomienda que se indique en tablas con las características más importantes de los mismos. En este caso puede hacerse referencia al PNO necesario.
- **Procedimiento:** Es obligatorio. Los verbos deben usarse en modo infinitivo (adicionar, observar, etc.) Y quién debe llevar a cabo cada paso.
- **Registro de datos.** Es obligatorio indicar que formatos se utilizan para cada caso.
- **Referencias:** Es obligatorio e incluye los PNO'S mencionados.
- **Anexos:** Es opcional. También deben llevar encabezados. Y pueden ser: gráficos, tablas, esquemas, formatos, datos, cálculos, ejemplos, fotografías, etc.

CAPITULO II.

AUDITORIAS

2.1 TIPOS DE AUDITORIAS

2.1.1 DEFINICIONES DE AUDITORIA

Como primer pregunta que nos debemos hacer para empezar a desarrollar esta parte de la investigación es ¿Qué es una auditoria?; ya que diversas organizaciones se han dado a la tarea de definirla.

El Comité Técnico de Auditorias de Calidad de Estados Unidos, la define como *una evaluación planeada independiente y documentada que se realiza para determinar el cumplimiento de los requerimientos acordados con anterioridad.*

La Food and Drug Administration (FDA) ha definido la auditoria de calidad como *un examen sistemático independiente del Sistema de Calidad, realizadas con una frecuencia suficiente para determinar si las actividades y los resultados de dichas actividades cumplen con los procedimientos del Sistema de Calidad, que estos procedimientos son implementados efectivamente, y son recomendables para obtener los objetivos del Sistema de Calidad.*

La definición de la organización Internacional de Normas (ISO) es definida como *sigue es un análisis sistemático e independiente para determinar si las actividades y sus resultados cumplen con las disposiciones establecidas y si estas son implementadas eficazmente y son apropiadas para alcanzar los objetivos.*

La división Canadiense de la Protección de la Salud (HPB) define de la siguiente manera es *un programa apropiado de auto inspección con el propósito de evaluar los cumplimientos con las GMP s en todos los aspectos de la producción y el control de calidad de los fabricantes o importadores.*

De todos los conceptos anteriormente descritos tomaremos lo más importante para homogenizar la definición, la cual quedaría de la siguiente manera: *La Auditoria de Calidad es una actividad documentada, independiente planeada que permite la evaluación continua por medio de la evidencia objetiva determinando si el Sistema de Calidad esta funcionando adecuadamente, permitiendo así tomar medidas preventivas y/o correctivas para evitar cometer errores.*

2.1.2 TIPOS DE AUDITORIAS

Las auditorias de calidad tienen varios enfoques tanto en empresas industriales como las prestadoras de servicios, suelen ser clasificadas en función de quien las realiza y la orientación a la cual es aplicable.

EN FUNCION DE QUIEN LAS REALIZA PUEDEN SER:

I. AUDITORIAS INTERNAS

Las auditorias internas o también llamadas como auditorias de primer orden, se realizan por el personal de la propia empresa pero no tiene responsabilidad directa sobre el área o actividad auditada, evaluando con los procedimientos e instructivos de trabajo propios de la empresa.

II. AUDITORIAS EXTERNAS

Las auditorias externas o también llamadas de segundo orden, son efectuadas por un organismo independiente o auditores ajenos a la empresa con un sistema propio.

EN FUNCION A SU ORIENTACIÓN SE CLASIFICAN EN:

I. AUDITORIAS A PROCESOS

Se realizan para verificar la conformidad del proceso, los operarios y el equipo en función de las especificaciones, características, técnicas y/o estándares predeterminados a fin de que el producto elaborado no se vea afectado. Estas auditorias se llevan a cabo ya sea al arranque de operaciones, durante o al final del proceso.

II. AUDITORIAS A PRODUCTO

Tienen como objetivo evaluar las características del producto, es decir cumple con los requisitos técnicos establecidos en las especificaciones, reglamentos y normas. Pero sobre todo, que cumpla con las necesidades y expectativas del cliente. Este tipo de auditorias son muy enriquecedoras en la Industria Farmacéutica debido a que por medio de las desviaciones encontradas se pueden mejorar las características del producto farmacéutico en cuanto al tipo de formulación, utilización de materias primas y otros insumos así como el mejoramiento del diseño y especificaciones.

III. AUDITORIAS AL SISTEMA DE CALIDAD

Se realizan para comprobar, mediante la evidencia objetiva, que el sistema de calidad es el adecuado y que se ha desarrollado y documentado de acuerdo a los requisitos especificados.

IV. AUDITORIAS PARA LA EVALUACIÓN A PROVEEDORES

Se realizan para determinar la capacidad que tienen los proveedores de brindar en la compra o contrato de un producto o servicio el suministro de un insumo de alta calidad. De esta manera se puede realizar la validación de proveedores teniendo en cuenta diversos aspectos de la organización como su capacidad de producción, transporte, medidas de seguridad, experiencia entre más.

V. AUDITORIAS FINANCIERAS

Se realiza por el personal que tiene formación y experiencia en procesos contables.

VI. AUDITORIAS DE CERTIFICACIÓN

Este tipo de auditorias son requeridas por aquellas empresas o instituciones que tienen y mantienen un sistema de calidad sólido debido a que la organización tiene la confianza de cumplir con todos los requisitos y estándares establecidos por la casa certificadora a la que se le pide el servicio. El obtener una certificación, nos da la confianza que en ese establecimiento se están brindando bienes y servicios de alta calidad y que pueden ser aceptados a nivel nacional e internacional.

Las Casas Certificadoras que prestan el servicio son organizaciones acreditadas, serias y comprometidas con llevar a cabo una auditoria imparcial, honesta y justa

2.2 VERIFICACIONES

No se consideran propiamente como auditorias, se realizan principalmente a empresas que prestan un servicio o producto que tiene ingerencia directa en la salud del ser humano, proporcionan información valiosa para la empresa auditada y al auditor, son realizadas por la Secretaria de Salud. Los motivos de estas son diversos, en la industria farmacéutica pueden aplicarse por apertura de una nueva área o planta, la verificación de algún producto o proceso. Los verificadores pueden evaluar y analizar todos aquellos datos que consideren necesarios con el fin de asegurar el cumplimiento de la

Ley correspondiente así como la garantía de que se está fabricando un producto de calidad y que no ponga en riesgo al consumidor. A diferencia de los demás tipos de auditorías estas verificaciones se realizan de manera sorpresiva, ya que no se da aviso de la fecha exacta en que se auditará.

2.3 PROFUNDIDAD Y ALCANCE DE LA AUDITORIA

La persona que solicita el servicio (cliente) quien determina el alcance y profundidad de la auditoría, a fin de satisfacer sus necesidades, especificando las normas o documentos que se requieren para auditar. Algunos de los documentos que son de interés en la Industria Farmacéutica en México son el Reglamento de Insumos para la Salud, la NOM-059-SSA, las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP s), la serie de NMX-CC-, las Buenas Prácticas de Laboratorio, las Guías de la CIPAM, la Norma Internacional ISO 9000, los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO s), expedientes bitácoras etc.

Como ya se mencionó los propósitos de una auditoría es la búsqueda de evidencias objetivas de las actividades que se realizan, y estas evidencias son los procedimientos e instrucciones de trabajo donde se describe el qué, como, con qué y cada cuando de las actividades propias de cada departamento, así como de los responsables de cada actividad; por lo que es importante el verificar que estos se lleven a cabo.

2.4 BENEFICIOS DE LA AUDITORIA

El principal beneficio de una auditoría es verificar el cumplimiento con los estándares de calidad, así como los requisitos regulatorios, pero además de obtener estos beneficios se obtienen otros más que nos permiten fomentar el trabajo en equipo, mejorar las operaciones internas del personal logrando una madurez y auto-reflexión, nos permite medir las mejoras e identificar y reducir los riesgos. Todos estos beneficios nos dan la oportunidad de optimizar cualquier actividad y sobretodo de crear una nueva cultura empresarial que nos permita fabricar o brindar un producto o servicio de con una calidad total.

2.5 ELEMENTOS INVOLUCRADOS EN UNA AUDITORIA

El papel de la dirección de la empresa es impulsar el proyecto de realización de auditorías, este impulso se traduce en un adecuado seguimiento de los resultados, así como de los planes de acción generados. Al efectuar una auditoría, ésta puede realizarse por un individuo o un equipo, en

cualquiera de los casos se debe designar a un responsable para llevar a cabo las auditorías (auditor líder), quien designa a auditores expertos, auditores en entrenamiento u observadores que sean aceptados por el cliente, por el auditado y por el auditor líder.

2.5.1 AUDITOR LÍDER

Es la persona responsable de la realización de una auditoría, es decir, organiza; es el responsable final de todo el proceso, es designado por la Dirección de la empresa para dirigir una auditoría de calidad, considerando su preparación, conocimientos, habilidades y experiencia en auditorías de Sistema de Calidad. También puede fungir como responsable de verificar la eficiencia de las acciones correctivas/preventivas aplicadas como consecuencia de la auditoría.

Puede realizar otro tipo de responsabilidades como:

- Ayudar en la selección del grupo auditor
- Preparar el plan y programa de auditorías
- Orientar al grupo auditor
- Distribuir y asignar actividades al grupo auditor
- Revisar la documentación generada antes y después de la auditoría
- Prescindir las reuniones previas y de clausura
- Informar cualquier obstáculo importante presentando durante la ejecución de la auditoría a la dirección o al representante de la organización auditada
- Tomar decisiones sobre los resultados
- Verificar el seguimiento y cierre de la auditoría
- Informar claramente las observaciones y/o no conformidades así como los resultados finales durante la reunión de clausura a la Dirección General

2.5.2 EL AUDITOR

Es la persona calificada para realizar auditorías de calidad. El personal seleccionado para llevar a cabo una auditoría debe ser independiente del área a auditar y debe tener la experiencia en cuanto a los propósitos, alcance y naturaleza de las actividades y se le dará autoridad para tomar decisiones finales con respecto a la conducción y observaciones de la auditoría.

Las responsabilidades con las que debe cumplir o cubrir un auditor son las siguientes:

- Planear y ejecutar las actividades asignadas en forma eficiente y efectiva
- Preparar los documentos de trabajo
- Recopilar y analizar las evidencias objetivas para emitir conclusiones
- Confirmar que los procedimientos y la información relacionada con el Sistema de Calidad sea conocida, entendida y usada por el personal de la organización que sé esta auditando
- Reportar al auditor líder los resultados y obstáculos presentados durante la ejecución de la auditoria
- Documentar las observaciones y las no conformidades
- Verificar la efectividad de las acciones correctivas tomadas como resultado de la auditoria
- Mantener y salvaguardar los documentos relacionados con la auditoria
- Participar en la elaboración del informe final
- Cumplir con los requisitos de confidencialidad y ética

El perfil del puesto que debe cubrir un auditor es tener un mínimo de cuatro años de experiencia practica adecuada (sin incluir el entrenamiento), dos años de los cuales por lo menos deben haber sido en actividades de Aseguramiento de Calidad, antes de asumir la responsabilidad para efectuar auditorias como auditor, el candidato debe haber obtenido experiencia en el proceso completo de auditorias según lo descrito en las Normas Mexicanas NMX-CC-7/1 Y NMX-CC-7/2. Esta experiencia debe haber sido obtenida participando en un mínimo de cuatro auditorias con duración total de por lo menos veinte días incluyendo la revisión de la documentación, actividades propias de auditorias e informes. Un auditor tiene la posibilidad de ser "Auditor Certificado", es decir, cuando tiene la capacidad de cumplimiento de requisitos específicos y que han sido demostrados.

2.5.3 EL AUDITOR EN ENTRENAMIENTO

Los candidatos a auditores deben haber terminado por lo menos la educación preparatoria, deben haber demostrado competencia para expresar conceptos e ideas, en forma clara y fluida tanto oral como por escrito. Deben tener un entrenamiento para efectuar y administrar auditorias.

El entrenamiento debe incluir lo siguiente:

- Conocimiento y comprensión de las normas contra las cuales pueden realizarse las auditorias al Sistema de Calidad.
- Técnicas de evaluación de exámenes, cuestionarios, evaluaciones e informes
- Habilidades adicionales requeridas para administrar una auditoria, tales como la planeación, organización, comunicación y dirección.

2.5.4 CARACTERÍSTICAS DEL BUEN AUDITOR

El éxito de una auditoria, depende en gran parte de la aptitud técnica y humana que presenten los auditores, es decir los conocimientos y actitudes que presenten ante el auditado dan la pauta para un buen desarrollo y obtención de resultados confiables ya que en muchas de las ocasiones las auditorias implican por su naturaleza, temor e incluso agresión hacia el auditado, por ello el perfil del buen auditor incluye que sea honesto, disciplinado, capacitado, analítico e imparcial, debe ser objetivo, intuitivo, diplomático, educado y tener la capacidad de poder comunicarse con facilidad en el lenguaje corporal y verbal.

Contrariamente, el auditor debe evitar a toda costa tener características como ser poco juicioso, tener una corta visión, indisciplinado, deshonesto, obstinado impaciente, agresivo, desorganizado. Así mismo el auditor, debe evitar usar palabras que no permitan sustentar una afirmación o una decisión importante. Se recomienda no personalizar una conclusión, resultado o disposición utilizando palabras como:

- Yo creo ...
- Yo siento.....
- Yo vi....
- De acuerdo a mis conocimientos.....
- Mi experiencia dice.....

Es recomendable utilizar palabras concisas como:

- Con base a... existe una observación en el área X
- De acuerdo con el requisito A de la norma Y
- Es incorrecta la aplicación del requisito Z
- Verifique el incumplimiento en el procedimiento X

2.5.5 EL CLIENTE

Es quien solicita el servicio, proporcionando los datos de la organización así como los documentos legales y técnicos. Esto aplica cuando se contratan los servicios de una organización externa para realizar la auditoría. En el caso de una auditoría interna se tiene acceso directo a la información debido a que el cliente es la dirección de la empresa.

Debido a la variación de casos, el cliente puede ser:

- Un organismo que desea tener auditado su propio Sistema contra alguna Norma de Calidad
- Un organismo que desea auditar con sus propios auditores o una tercera parte del Sistema de Calidad de un proveedor.
- Una agencia independiente autorizada para determinar si el Sistema de Calidad provee el control adecuado de los productos o servicios que se entregan.
- Una agencia independiente asignada para efectuar una auditoría con el objeto de documentar el Sistema de Calidad del organismo auditado en un registro.

2.5.6 EL AUDITADO

Es aquella organización la cual va a ser auditada, de igual manera juega un papel muy importante en la ejecución de la auditoría ya que si el auditado no coopera con estar disponible en la fecha y hora asignadas, está retrasará las actividades y hay riesgo de no cumplir con los objetivos propuestos. Es necesario proporcionar la documentación y tenerla preparada para evitar las interrupciones y sobre todo el nerviosismo que en muchas de las ocasiones no permite el auditado responder adecuadamente a lo que se le solicita, a pesar de que sí cumpla con lo que se le pide.

Debe comprender las preguntas que realice el auditor para no desviarse, salirse del tema o mostrar información que no fue requerida, lo que, en vez de ayudarlo lo perjudica más por no ser honesto, y responder "no lo tengo".

Aceptar las observaciones del auditor ayudará al auditado en la toma de acciones correctivas o preventivas así como el evitar entrar en conflictos para demostrar quién tiene la razón.

Las responsabilidades del auditado son el informar a los empleados involucrados sobre los objetivos y alcance de la auditoría, tomar nota de las observaciones hechas por el auditor, proveer todos los recursos necesarios para que el proceso sea efectivo y eficiente, no permitir que personal ajeno al área conteste preguntas a menos que se lo indiquen, no intentar el soborno, solicitar que repitan la pregunta cuando no es entendida, recordar que el auditor no audita su trabajo, actividades

o conocimientos, solo audita el Sistema, determinar e iniciar las acciones correctivas con base al informe de la auditoria.

2.6 ETAPAS DE LA AUDITORIA

Una auditoria lleva una secuencia lógica, en sus primeras etapas se deben de definir las actividades a auditar, el personal a auditar, la nominación del grupo auditor y la elaboración de las guías de verificación o documentos de ayuda. Otra de las etapas más importante es la Reunión de Apertura, ya que se determinan las normas que se toman como referencias al auditar, se dan a conocer el alcance y los objetivos de la realización de las auditorias así como la aclaración de cualquier duda.

Al realizarse una de las etapas más importantes de la auditoria, es decir, al momento en que se recopila la evidencia, está puede ser reunida por medio de entrevistas, documentos, registros, tomo de muestras, observación física, mediciones, etc. En las siguientes etapas se debe de documentar los resultados obtenidos de está recopilación de evidencia y paso al seguimiento para verificar que se hayan corregido las desviaciones encontradas para realizar la última etapa que es el cierre de la auditoria, donde se da por terminado el proceso ya que el auditado cumple con las especificaciones internas y se han logrado los objetivos del programa de auditorias.

2.6.1 PREPARACIÓN DE LA AUDITORIA

La preparación de una auditoria la deben de realizar la Dirección y el Equipo Auditor, ya que el pleno convencimiento de la dirección en que se realice un programa de auditorias permitirá que estas se lleven en un buen contexto y así lograr los objetivos.

Para preparar una auditoria se necesita de un plan en el que se requiere identificar las metas, el alcance, las áreas o productos a ser auditados, los documentos de referencia bajo los cuales se llevará a cabo la auditoria, el equipo auditor, fecha e itinerario de la auditoria, e identificación del personal auditado. Una vez establecido el plan de auditorias, lo más importante es desarrollar un programa de "sensibilización" de todo el personal involucrado en la auditoria dando a conocer los motivos y beneficios que esta actividad tiene.

2.6.2 DOCUMENTOS DE TRABAJO

Al llevarse a cabo la auditoria se van generando documentos, al auditor, es responsable de elaborarlos y salvaguardarlos. Estos documentos son las listas de verificación que nos proporcionan la evidencia objetiva que nos permite llevar un orden en el desarrollo de la auditoria para garantizar que se logre adecuadamente el alcance, al igual que nos facilita la preparación de reportes, ayudan a un auditor en entrenamiento para adquirir la experiencia necesaria en la ejecución o realización de una auditoria.

Proporciona información que más adelante puede ser utilizada como historial de cumplimiento y para la planeación de futuras auditorias. Una lista de verificación puede tener diversos formatos ya que cada empresa diseña el que considera como funcional, pero, en general contienen los siguientes datos:

- Designación del documento
- Nombre y dirección de la empresa
- Fecha de la auditoria
- Área auditada y responsables
- Miembros del equipo auditor
- Preguntas específicas con la referencia correspondiente
- Espacios para observaciones
- Paginación

2.6.2 NOTIFICACIONES DE LA AUDITORIA

Las notificaciones de auditoria y los formatos para reportar las observaciones y desviaciones detectadas durante la auditoria son otros documentos que se generan (Anexo B).

La organización, área o departamento debe ser notificado con un tiempo razonable, con el propósito de dar a conocer la fecha de realización de la auditoria, proporcionar los nombres que integran el grupo auditor, la(s) norma(s) y documentos del Sistema de Calidad que apoyarán la auditoria y que área, producto, departamento, personal (u otro), se auditará.

2.6.3 EJECUCIÓN DE LA AUDITORIA

Es cuando se lleva a cabo propiamente la auditoria. Está constituida de varios pasos que son:

A) REUNION DE APERTURA

Llegado el día y la hora programados se reúnen las partes interesadas, es recomendable que se inicie con un proceso de presentación, esto con la finalidad de romper el hielo y crear un ambiente de cordialidad entre ambas partes. Una vez presentado el equipo auditor y los auditados se verifica que cualquier detalle quede aclarado para que se pueda iniciar formalmente la auditoria. En el caso de las auditorias internas, los involucrados suelen conocerse y no es necesaria la presentación formal, pero sí se considera adecuado el iniciar dando un resumen de lo que se auditará y el objetivo del por qué se realiza la auditoria.

B) RECOPIACIÓN DE EVIDENCIA

En ese momento se inicia el proceso de recopilación de evidencias, que consiste en identificar los aspectos que representan algún tipo de incumplimiento detectado por medio de la entrevista, documentos u observaciones de actividades y condiciones en las áreas involucradas.

Es importante señalar que solo se recogen evidencias objetivas y demostrables, ya que las que no tengan fundamento se desechan.

Se complementa la auditoria con el análisis de registros que proporcionan evidencias inequívocas de que algo se ha hecho o no, comprobando su veracidad constatando el contenido de una muestra representativa con otro registro vinculado.

2.6.4 INFORME FINAL

Al termino de la auditoria, previo a la preparación del informe, el equipo auditor se reúne para determinar las evidencias que se darán a conocer como no conformidades o desviaciones que pueden ser críticas, mayores o menores, así como presentar a la alta Gerencia y/o Dirección las observaciones del auditor líder.

El grupo auditor debe elaborar y entregar el reporte de auditoria en plazo corto y definido (Anexo C). Un informe, presenta los resultados obtenidos en la auditoria, además de las observaciones que pueden ayudar al auditado en la toma de medidas preventivas y/o correctivas, además de contener lo siguiente:

1. Designación del Documento
2. Fecha del reporte
3. Área o Departamento Auditado
4. Responsables
5. Descripción y clasificación de las No-Conformidades
6. Acción Correctiva Propuesta
7. Tiempo de Implantación
8. Nombre y Firma del Auditor Líder

2.6.5 DISTRIBUCIÓN DEL INFORME

El informe se envía al área o departamento auditado a la brevedad posible pasada la fecha de la auditoria para corregir cualquier desviación. Cabe señalar que no todas las no-conformidades deben esperar a la distribución del informe de auditorias, ya que algunas acciones se deben realizar inmediatamente. Si es necesario, el informe se envía a la alta Gerencia o a la Dirección.

2.6.6 SEGUIMIENTO

Con base al informe de auditoria, la parte auditada debe elaborar un programa de acciones correctivas para eliminar las causas que dieron su origen. En esta etapa el auditor debe verificar que cada no-conformidad ha tenido una acción correctiva o preventiva y que estas sean las adecuadas para evitar la recurrencia por una *auditoria de seguimiento* (Anexo D). Después de verificar la implantación de la acción correctiva, el auditor prepara el informe de seguimiento que se distribuye de igual forma que el informe de auditoria original (Anexo E). El seguimiento de acciones compete al área auditada y al auditor líder. Si el auditor líder está de acuerdo con las acciones correctivas tomadas, se considera cerrada la auditoria, si no esta conforme, la auditoria no se puede cerrar y puede decidir si la solicitud de acción correctiva se envíe a un nivel más alto o se realice un segundo seguimiento.

2.6.7 CIERRE DE LA AUDITORIA

Es la última etapa del proceso de la auditoria que de igual manera se documenta por medio de un reporte donde se establecen todas las observaciones y no-conformidades encontradas como las desviaciones corregidas, marcadas en el informe como "cumplidas" revisando toda la documentación involucrada (Anexo F).

2.6.8 REGISTROS

El líder responsable del Sistema de Auditorias Internas, el asignado por la empresa debe contar con un archivo donde se conserve la evidencia documentada de todas las etapas del proceso así como los documentos:

- 1 Procedimientos
- 2 Políticas
- 3 Certificado de Calificación de los Auditores
- 4 Programa de Auditorias
- 5 Plan de Auditoria
- 6 Lista de Verificación
- 7 Reporte de auditoria
- 8 Reporte de Acciones Correctivas
- 9 Informes de seguimiento
- 10 Cierre Formal de Auditoria

El auditor líder también debe conservar la documentación para usos futuros y mantener los registros en orden y actualizados.

Una vez concluidas las etapas de la auditoria, y finalizado el cierre, el grupo auditor debe dar las gracias al personal de la organización auditada por su asistencia y cooperación durante el desarrollo, de esta forma se da por concluida la auditoria.

2.7 FUNCION DE LA CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

Al definir calidad, podemos hablar de corriente de pensamientos, ideologías y estrategias de trabajo, sin embargo, nos quedaremos con la idea de que calidad significa un conjunto de características que confieren la aptitud de satisfacer necesidades.

En su interpretación más apegada a la Industria Farmacéutica, la calidad significa; calidad del producto e insumos, del proceso de producción, de la calidad del servicio y de los trabajadores.

Para la gerencia, es tener Control de Calidad en cada etapa del proceso, involucrar al trabajador a través de la capacitación. Aunque en los últimos días el concepto a cambiado significativamente y está formando parte de una estrategia administrativa para mantener la competitividad, la cuál puede ser evaluada por medio de:

- El cumplimiento de las Buenas Practicas de Fabricación que son un conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que el producto farmacéutico tenga y mantenga su pureza, concentración, potencia e inocuidad requerida para su uso.
- El cumplimiento de las Buenas Practicas de Laboratorio, donde su objetivo es tener resultados exactos y precisos en los análisis, que sean confiables y nos den la seguridad de que el producto es liberado para su comercialización y cumple con las especificaciones de calidad con las que fue diseñado.

Una forma de saber si se está llevando a cabo este cumplimiento, es por medio de las auditorias de calidad.

2.8 DEPARTAMENTO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO

Como ya se mencionó anteriormente, para garantizar un producto farmacéutico de calidad hay que cumplir con pruebas de laboratorio, como por ejemplo con los análisis fisicoquímicos químicos y microbiológicos de un producto. Esta última es la actividad que realiza el departamento el cual fue auditado en la presente investigación.

El departamento de Control Microbiológico se dedica principalmente a la realización de pruebas que permiten demostrar que en un producto farmacéutico, las materias primas con las que está fabricado, las condiciones de las áreas, el personal y los equipos donde se realizó su producción están libres de contaminación por microorganismos.

Para cada forma farmacéutica o presentación existe un "límite microbiano", el cual representa el máximo número de microorganismos que se pueden encontrar, por ejemplo en un ungüento se permite un mayor número de microorganismo ya que es de uso tópico que en un jarabe, en caso opuesto en un inyectable las condiciones deben ser estériles; es decir no se permite el desarrollo de ningún microorganismo.

De igual manera existen microorganismos objetables, los cuales varían de una forma farmacéutica a otra, ya que pueden causar un mayor daño en vez de curar. Un producto farmacéutico destinado para uso vaginal debe estar libre de los siguientes microorganismos objetables como *Streptococos*, *Stafilococos*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, o, un producto administrado por vía oral debe serlo de *E. coli* y *Salmonella* principalmente.

A grandes rasgo, estas son algunas de las actividades que se realizan en este departamento.

2.8.1 ACTIVIDADES PROPIAS DEL AUDITADO

El departamento auditado realiza, entre otros, el monitoreo microbiológico de productos farmacéuticos.

Se verifica como esta la distribución de las diferentes áreas del laboratorio y en base a todo lo antes mencionado, si cumple o no, si cada una de éstas cuenta con cierto número de Procedimientos Normalizados de Operación (PNO'S) que describen las actividades realizadas. Por ejemplo En el área limpia, lugar donde se realizan pruebas y siembras que requieren de condiciones de asepsia.

Esta área involucraría los siguientes PNO'S:

- Limpieza y sanitización del área limpia
- Promoción de crecimiento
- Resiembra de microorganismos
- Monitoreo ambiental del área limpia
- Reto a sanitizantes
- Valoración microbiológica de antibióticos.

Como un trabajo previo a una auditoria, será necesario revisar y actualizar la lista de procedimientos existentes (Anexo A), a fin de que éstos describan exacta y clara las actividades que se realizan. si cumplen con el formato establecido en el artículo 110 y 111 del Reglamento de Insumos para la Salud

Revisar si todos los instrumentos y equipos del Departamento de Control microbiológico se les asignó un código, el cual nos permite su identificación y facilita el control de los mismos. Si se

cuenta con un programa de mantenimiento y calificación de equipos e instrumentos. Si se tiene la documentación necesaria para comprobarlo.

Si se encuentra documentado mediante bitácoras el registro de uso de los equipos e instrumentos.

2.8.2 PREPARACIÓN DE LA GUÍA DE VERIFICACIÓN PARA AUDITAR AL DEPARTAMENTO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO.

Como ya se mencionó la Guía de Verificación, es uno de los documentos de trabajo más importantes al realizar una auditoría y a continuación describiré la guía de verificación que se utilizará para auditar al departamento de Control Microbiológico.

A) PROPÓSITO DE LA GUÍA DE VERIFICACIÓN.

EL elaborar una guía o lista de verificación sirve como una herramienta que facilita la ejecución y recopilación de evidencias objetivas. También sirve de guía para el auditor, asegura el éxito de la auditoría ya que permite dividir la auditoría en áreas o puntos específicos.

Los propósitos y beneficios de los que este documento se obtienen son:

- Para desarrollar ordenadamente la auditoría
- Como evidencia objetiva de la auditoría
- Refresca la memoria
- Para dar continuidad
- Para registrar y ordenar los datos tomados durante la auditoría
- Ayuda en la preparación de resumen e actividades informes que serán presentados en el seguimiento y cierre de la auditoría.

El formato de las guías de verificación varía, pero es importante señalar que las preguntas que se plasmen en ella deben ser objetivas y relacionadas a la verificación de evidencias objetivas.

Cada pregunta que sea formulada, debe estar apoyada por un documento de referencia. Así como el formato puede variar, los cuestionamientos o contenido de la guía de verificación pueden cambiar, esto dependerá de que tan "rigurosa" se desee realizar la auditoría y los alcances y objetivos de la misma.

B) DOCUMENTOS APLICABLES AL DEPARTAMENTO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO

Dependiendo del área que se audita, se escogen los documentos o reglamentaciones que sean necesarios y que mencionen en su contenido, los puntos aplicables a las actividades directamente involucradas con el auditado.

Los documentos aplicables son:

- Reglamento de Insumos para la Salud
- NOM-059-SSA1-1993 Buenas Prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
- CIPAM "Guía para el control microbiológico de medicamentos"
- CIPAM "Guía de procedimientos adecuados de limpieza de material analítico"
- CIPAM "Guía de validación de medios de cultivo"
- Buenas Prácticas de Laboratorio

C) FORMATO.

I. ENCABEZADO:

- Fecha en que se realizó la auditoria
- El área a auditar
- La conformación del grupo auditor
- Paginación.

II. CUERPO DE LA GUIA DE VERIFICACIÓN.

- REFERENCIA. Indica la normatividad que aplica mencionando el artículo, Sección o punto en específico donde se haga referencia en el cuestionamiento.
- Punto a Verificar: aquí se describe el cuestionamiento que se realizará al auditado, basado como ya se mencionó en los documentos aplicables.
- Sí/ No Desviaciones: en estas secciones se coloca el resultado el cuestionamiento, es una especie de calificación donde se anotan los motivos de las desviaciones o no conformidades encontradas.
- OBSERVACIONES: Se realizan anotaciones cuando sean necesarias a fin de recordar motivos importantes que se hayan generado o para esclarecer alguna información.

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____ Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: CONTROL MICROBIOLÓGICO

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF.	PUNTO A VERIFICAR	SI	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
R.I.S NOM-059 CIPAM B.P.L.					
B.P.L.	CADA CUANDO SE CAMBIAN LOS FILTROS HEPA:				
	DOCUMENTACIÓN				
NOM-059 6.2	CUENTA CON EL ORGANIGRAMA DE LA EMPRESA				
NOM-059 6.1	CUENTA CON DESCRIPCIÓN DE PUESTOS DE SU ÁREA				
NOM-059 6.2	SE HA CAPACITADO AL PERSONAL EN CONCEPTOS BÁSICOS DE MICROBIOLOGIA. PRESENTA EVIDENCIAS				
RIS Art. 110 NOM-059 7.1.4	CUNETA CON PROCEDIMIENTOS PROPIOS DEL AREA QUE CONTENGAN: TITULO, TIPO DE PROCEDIMIENTO, OBJETIVO, ALCANCE, RESPONSABILIDADES, DESARROLLO DEL PROCESO Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS				
RIS Art. 111 NOM-059 7.1.4	LOS PROCEDIMIENTOS A LOS QUE SE REFIERE EL ARTICULO ANTERIOR, CUENTAN CON NOMBRE Y FIRMA DE LAS PERSONAS QUE LO ELABORARON, REVISARON Y AUTORIZARON (RESPONSABLE SANITARIO) NUMERO SECUENCIAL, FECHA DE EMISIÓN O ACTUALIZACIÓN				

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____ Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: CONTROL MICROBIOLÓGICO

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR	SI	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
B.P.L.	CUALES SON LOS INSTRUMENTOS Y EQUIPO CON LOS QUE CUENTA:				
NOM-059 9.12.5	CUENTA CON UN PROGRAMA DE CALIBRACIÓN DE INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN PRESENTA EVIDENCIA				
B.P.L.	CUENTA CON BITÁGORAS DE REGISTRO DE USO DE EQUIPOS E INSTRUMENTO.				
NOM-059 9.12.8	CUENTA CON PROCEDIMIENTOS DE CADA AREA PARA LA LIMPIEZA, MANTENIMIENTO Y OPERACIÓN DE CADA UNO DE LOS INSTRUMENTOS Y EQUIPOS DEL LABORATORIO				
B.P.L.	CUENTA CON PNO DEL MANEJO DEL AUTOCLAVE				
CIPAM	CUENTA CON PNO DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL LIMPIO				
CIPAM	CUENTA CON PNO DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL SUCIO				
CIPAM	CUENTA CON CALIBRACIÓN DE LOS MANÓMETROS DE LA AUTOCLAVE, PRESENTE EVIDENCIA				
CIPAM	CUENTA CON PNO DE OPERACIÓN Y MONITOREO AMBIENTAL DE ESTUFAS				
CIPAM	CUENTA CON TERMÓMETROS CALIBRADOS, PRESENTE EVIDENCIA				

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____ Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: CONTROL MICROBIOLÓGICO

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR	SÍ	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
RIS Art 9º NOM-059 9.12.2	CUENTA CON PROCEDIMIENTOS PARA EL MUESTREO DE MATERIA PRIMA, PRODUCTO A GRANEL Y TERMINADO, ASÍ COMO MATERIAL DE EMPAQUE QUE REQUIERA DE CUENTA MICROBIANA				
NOM-059 9.12.12 CIPAM	CUENTA CON PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE ACUERDO A LA FEUM Y SUPLEMENTOS VIGENTES U OTRA BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA RECONOCIDA INTERNACIONALMENTE				
CIPAM	CUENTA CON PNO DE MONITOREO AMBIENTAL DE AREAS DE PRODUCCIÓN Y MICROBIOLOGÍA DONDE SE ESTABLECE QUE SE DEBE DE HACER EN CASO DE SOBREPASAR LÍMITES				
CIPAN	CUENTA CON PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA DE MATERIAL.				
CIPAM	CUENTA CON PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS OBJETABLES (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> y <i>Salmonella s.p.</i>) EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y MATERIAL DE EMPAQUE PRIMARIOS NO ESTERILES				
CIPAM	CUENTA CON UN LISTADO DE LAS CEPAS EXISTENTES				

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____ Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: CONTROL MICROBIOLÓGICO

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR	SÍ	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
CIPAM	CUENTA CON PROCEDIMIENTOS DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS EN EXISTENCIA POR MEDIO DE BIOQUÍMICAS U OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS.				
	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS				
CIPAM	CUENTA CON UN INVENTARIO DEL MATERIAL EN EXISTENCIA DEL LABORATORIO				
RIS Art. 105	CUENTA CON UN PNO DE VESTIDO EN AREAS LIMPIAS				
CIPAM	UTILIZA AGUA PURIFICADA PARA ANÁLISIS Y LLEVA UN CONTROL MICROBIOLÓGICO PERIÓDICAMENTE DE ESTA				
CIPAM	LLEVA ALGUN REGISTRO DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DEL AGUA PURIFICADA Y AGUA POTABLE PRESENTA EVIDENCIA				
B.P.L.	CUENTA CON PLANOS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO DE EL AGUA POTABLE				
CIPAM	CUENTA CON UN CEPARIO RECONOCIDO POR LA S.S.A				
B.P.L.	CUENTA CON UN PNO DE CONTINGENCIA EN CASO DE ROMPERSE ALGUNA CEPA				

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____

Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: CONTROL MICROBIOLÓGICO

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR	SÍ	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
CIPAM	REALIZA RESIEMBRAS POR DUPLICADO, CON QUE FRECUENCIA LAS REALIZA, SE ENCUENTRA PERFECTAMENTE IDENTIFICADAS ASI COMO SE LLEVA UN REGISTRO DE ESTAS. REALIZA BIOQUÍMICAS A LAS CEPAS CON QUE MÉTODO.				
NOM-059 9.12.12 CIPAM	UTILIZA CONTROLES NEGATIVOS Y POSITIVOS COMO TESTIGOS DURANTE EL USO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO. MUESTRE SUS REGISTROS Y PROCEDIMIENTO CORRESPONDIENTE.				
CIPAM	CUENTA CON TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA REALIZAR LA POTENCIA DE ANTIBIÓTICOS				
CIPAM	CUENTA CON REGISTRO DE LOS PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN MUESTRE EVIDENCIA				
CIPAM	REALIZA MONITOREO AMBIENTAL DE FORMA PERMANENTE A LAS AREAS LIMPIAS				
B.P.L.	CUENTA CON UN PNO DE RETO DE SANTIZANTES PRESENTA EVIDENCIA				
B.P.L.	CUENTA CON TÉCNICAS DE RETO A SANTIZANTES CON LA MICROBIOTA DE LA PLANTA				
CIPAM	TIENE LIMITES MICROBIANOS INTERNOS OFICIALES QUE GARANTICEN LA CALIDAD DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS ASI COMO DEL PRODUCTO				

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____

Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: CONTROL MICROBIOLÓGICO

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR	SI	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
NOM-059 11	COMO DESECHA LOS REACTIVOS, SOLUCIONES MEDIOS DE CULTIVO Y DEMAS RESIDUOS				
NOM-059 9.12.12 CIPAM	CUENTA CON LAS EVALUACIONES AL ÁREA ASÉPTICA DE MICROBIOLOGÍA MUESTRE SUS REGISTROS Y PROCEDIMIENTO CORRESPONDIENTE.				
CIPAM	CUENTA CON LISTA DE ESTANDARES PRIMARIOS Y SECUNDARIOS PARA LAS VALORACIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS Y VITAMINAS				
CIPAM	CUENTA CON REGISTRO DE LOS DESCARGOS DE ESTANDARES ASI COMO REPORTES DE ESTANDARIZACION MUESTRE EVIDENCIA				
CIPAM	CUENTA CON UN PNO DE BIOTERIO DONDE SE MUESTRE EL PLANO DE LAS DIFERENTES AREAS QUE LO CONFORMAN				
B.P.L.	CUENTA CON U N HISTORIAL CLINICO DE CADA CONEJO ASI COMO SU HISTORICO DE PRUEBAS PRESENTA EVIDENCIA				
B.P.L.	CUENTA CON UN ROL DE SANITIZANTES Y LA FORMA DE ESTABLECER DICHO ROL				
CIPAM	EL PERSONAL DEL LABORATORIO CUENTA CON HISTORIAL MEDICO Y CLINICO, MOSTRAR EVIDENCIA				
NOM-059 11	CUENTA CON LAS TENDENCIAS AMBIENTALES DE LA PLANTA MOSTRAR EVIDENCIA				

La anterior guía de verificación, nos permite conocer el funcionamiento y forma de trabajo del departamento de control microbiológico y sobre todo, sus necesidades en ese momento. Cabe mencionar que esta guía de verificación en su contenido fue diseñada para realizar una "primera auditoria" o de tipo diagnóstico.

Las guías de verificación anteriormente revisadas, son un ejemplo de una auditoria al departamento de Microbiología, pero durante la auditoria realizada a un proceso de cualquier producto, ya sea por parte de la Secretaría de Salud, de algún cliente al cual se le maquite o simplemente como **auditerias internas** realizadas por el departamento de la Gerencia Técnica también se acude a revisar algunos aspectos del Departamento de Microbiología.

A continuación pondremos un ejemplo de cómo sería una guía de verificación durante una auditoria del proceso de un producto, pongamos como ejemplo un **Antibiótico Inyectable**.

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____ Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: DEPTO. INYECTABLES " ANTIBIÓTICOS 80 mg"

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR <i>Monitoreos ambientales</i>	SI	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
NOM-059 9.12.12 CIPAM	CUENTA CON LOS MONITOREOS AMBIENTALES AL AREA ASEPTICA DE MIVROBIOLOGIA MUESTRE SUS REGISTROS Y PROCEDMIENTO CORRESPONDIENTE.				
CIPAM	CUENTA CON LOS MONITOREOS AMBIENTALES AL AREA ASEPTICA DE INYECTABLES MUESTRE SUS REGISTROS Y PROCEDIMIENTO CORRESPONDIENTE				
CIPAM	CUENTA CON REGISTRO DE LOS DESCARGOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN EL MONITOREO, ASÍ COMO LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO, MUESTRE EVIDENCIA				
CIPAM	REGISTRO DE LAS CEPAS EMPLEADAS EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO				
B.P.L.	CUENTA CON LA EVIDENCIA DE QUE EL PERSONAL QUE REALIZA EL MONITOREO ESTA CALIFICADO				
B.P.L.	EL PERSONAL DEL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA QUE INGRESA CUENTA CON EXAMENES MÉDICOS Y CLÍNICOS MOSTRAR EVIDENCIA				
CIPAM	MOSTRAR LA EVIDENCIA DE LA ÚLTIMA CALIBRACIÓN DEL CENTRÍFUGO DE AIRE EMPLEADO EN EL MONITOREO				
NOM-059 11	CUENTA CON INCUBADORAS VIGENTES EN LA CALIBRACIÓN PARA LA INCUBACIÓN DE MEDIOS				

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____ Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: DEPTO. INYECTABLES "ANTIBIÓTICOS DE 80 mg"

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR PRUEBA DE ESTERILIDAD	SÍ	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
NOM-059 9.12.12 CIPAM	CUENTA CON EL PROCEDIMIENTO Y REGISTRO DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD				
CIPAM	MOSTRAR LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS EMPLEADOS EN LA PRUEBA				
CIPAM	CUENTA CON LA EVIDENCIA DE QUE EL PERSONAL QUE REALIZA LA PRUEBA ESTA CALIFICADO				
CIPAM	MOSTRAR LOS REGISTROS DE LAS CASCADAS DE PRESIÓN DEL ÁREA ASÉPTICA DE MICROBIOLOGÍA				
B.P.L.	CUENTA CON EQUIPO CALIFICADO: C.F.L. Y EL ÁREA ASÉPTICA DE MICROBIOLOGÍA				
B.P.L.	CUENTA CON UN PROCEDIMIENTO DE VESTIDO PARA INGRESAR A A. ASÉPTICAS				
CIPAM	PIROGENOS				
NOM-059 11	CUENTA CON LOS REGISTROS DE LAS PRUEBAS DE PIROGENOS DEL ANTIBIÓTICO				
CIPAM	MUESTRE EL HISTÓRICO DE PRUEBAS Y CLÍNICO DE LOS CONEJOS EMPLEADOS				
B.L.P.	EL PERSONAL QUE REALIZA LA PRUEBA ESTA CALIFICADO				
NOM-059 11	CUENTA CON EL PROCEDIMIENTO DE ESTA PRUEBA MUESTRE EVIDENCIA				

**GUÍA DE VERIFICACIÓN
AUDITORIA INTERNA**

FECHA DE LA AUDITORIA: _____ Página: ___ de ___

ÁREA AUDITADA: DEPTO. INYECTABLES "ANTIBIÓTICO 80 mg"

GRUPO AUDITOR: Nombre del auditor líder

Nombre de los auditores

Nombre del auditor en entrenamiento

REF. R.I.S NOM 059 CIPAM B.P.L.	PUNTO A VERIFICAR VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA	SÍ	NO	DESVIACIÓN	OBSERVACIONES
NOM-059 9.12.12 CIPAM	CUENTA CON EL PROCEDIMIENTO Y REGISTRO DE LA PRUEBA DE VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA				
CIPAM	MOSTRAR LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS EMPLEADOS EN LA PRUEBA				
CIPAM	CUENTA CON LA EVIDENCIA DE QUE EL PERSONAL QUE REALIZA LA PRUEBA ESTA CALIFICADO				
CIPAM	MOSTRAR LA LISTA DE ESTANDARES PRIMARIO Y SECUNDARIOS EMPLEADOS				
B.P.L.	CUENTA CON LOS REGISTROS Y DESCARGOS DE ESTANDARES				
B.P.L.	CUENTA CON UN PROCEDIMIENTO DE ESTANDARIZACIÓN				
CIPAM	PROCESO				
NOM-059 11	CUENTA CON LOS REGISTROS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL AGUA CON LA QUE SE FABRICO DICHO INYECTABLE (LAL, CUENTA MICROBIANA)				
CIPAM FEUM NOM-059	CUENTA CON LOS REGISTROS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL MATERIAL DE EMPAQUE (LAL, PIROGENOS, SEGURIDAD, ESTERILIDAD)				
CIPAM FEUM NOM-059	CUENTA CON LOS REGISTROS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS AL PRINCIPIO ACTIVO (PIROGENOS, VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA, CUENTA MICROBIANA, ESTERILIDAD)				
CIPAM FEUM NOM-059	CUENTA CON LOS REGISTROS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS A LOS EXCIPIENTES				

CONCLUSIONES

La Microbiología Farmacéutica tiene diferentes aplicaciones en la Industria, unificando todo lo que aquí se menciona, los conocimientos y la práctica se podrá cumplir con los requisitos normativos y garantizar una auditoria con la menor cantidad de desviaciones ó puntos de mejora.

Por medio de la implantación de Auditorias internas, se logra obtener una **mejora continua**, a la actualización, a una reorganización del trabajo e incluso la actitud del personal que por lo regular se siente amenazada con una auditoria tratará de mantener lo bueno que se tiene y corregir aquellos puntos que no cumplen con las normas y las Buenas Prácticas de Laboratorio. Esto es importante, ya que estos son un factor clave en una auditoria, la buena relación entre auditados y auditores y del compromiso de ambas partes.

El contar con un plan de auditorias internas, es importante para los auditados ya que se les proporcionan armas para "enfrentar" una auditoria externa. Además de que es vital para la calidad total, siendo el mayor objetivo de éstas el monitorear, obtener y asegurar la fabricación de productos farmacéuticos confiables para el cliente.

Todo esto es sólo algunas de las bases, pero la más importante es la participación del recurso humano y su compromiso, es decir seres humanos de calidad ya que sólo éstos son capaces de hacer productos de calidad.

De esta manera se cumplen los objetivos planteados en este trabajo y no sólo se cumplió con lo planteado sino el de **hacer vislumbrar la importancia de un cambio de actitudes para una mejora continua.**

ANEXOS

ANEXO B

NOTIFICACIÓN DE AUDITORIA INTERNA

FECHA: _____

NUM. AUDITORIA: _____

DEPARTAMENTO A AUDITAR : _____

PERSONAL RESPONSABLE DEL DEPARTAMENTO QUE SE AUDITARÁ:

DIA (S) QUE SE LLEVARÁ A CABO LA AUDITORIA: _____

DOCUMENTOS APLICABLES: _____

COMPOSICIÓN DEL GRUPO AUDITOR: _____

ATENTAMENTE

LA DIRECCIÓN

ANEXO C

REPORTE DE AUDITORIA INTERNA

FECHA DE AUDITORIA: _____ NUM. AUDITORIA: _____

FECHA DE REPORTE: _____

DEPARTAMENTO AUDITADO: _____

AUDITADOS: _____

AUDITORES: _____

CONFORMIDADES : _____

ACCIONES SUSCEPTIBLES DE MEJORA:

(Clasificación de defectos: críticos, mayores y menores)

TIEMPO EN QUE SE CORREGIRAN LAS NO CONFORMIDADES:

(A partir de la fecha en que se emite el reporte)

RESPONSABLES: _____

ATENTAMENTE

AUDITOR LIDER

ANEXO D

NOTIFICACIÓN DE SEGUIMIENTO DE AUDITORIA

FECHA: _____

NUM. AUDITORIA: _____

FECHA Y HORA EN QUE SE DARA SEGUIMIENTO A LA AUDITORIA:

DEPARTAMENTO AUDITADO: _____

AUDITADOS: _____

AUDITORES: _____

PUNTOS A VERIFICAR : _____

ATENTAMENTE

AUDITOR LIDER

ANEXO E

REPORTE DE SEGUIMIENTO DE AUDITORIA

FECHA DE REPORTE: _____ NUM. AUDITORIA : _____

DEPARTAMENTO AUDITADO: _____

FECHA DE SEGUIMIENTO DE AUDITORIA: _____

AUDITADOS: _____

AUDITORES: _____

VERIFICACIÓN DE NO CONFORMIDADES CUMPLIDAS:

NO CONFORMIDADES SIN CUMPLIR:

Clasificación de defectos: criticos, mayores y menores.

TIEMPO EN QUE SE CORREGIRAN LAS NO CONFORMIDADES:

A partir de la fecha en que se emite el reporte

RESPONSABLES: _____

ATENTAMENTE

AUDITOR LIDER

ANEXO F

REPORTE FINAL DE AUDITORIAS INTERNAS

FECHA: _____ NUM. AUDITORIA: _____

DEPARTAMENTO AUDITADO: _____

AUDITADOS: _____

AUDITORES: _____

VERIFICACIÓN DE CUMPLIMIENTO A NO CONFORMIDADES:

Se indican todos los puntos en los que se cumplió satisfactoriamente

RESPONSABLES: _____

DESVIACIONES NO CUMPLIDAS: _____

RESPONSABLES: _____

DICTAMEN: _____

ATENTAMENTE

AUDITOR LIDER

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

BPF'S	Buenas Prácticas de Fabricación
BPL'S	Buenas Prácticas de Laboratorio
CIPAM	Comisión Interinstitucional de Procedimientos Adecuados de Manufactura
CM	Control Microbiológico
FDA	Food and Drug Administration
GLP'S	Good Laboratory Procedures
GMP'S	Good Manufacturing Procedures
HPB	Health and Protection Branch
ISO 9000	International Standard Organization
NOM-059	Norma Oficial Mexicana emitida por la Secretaría de Salud
NMX-CC	Normas Mexicanas
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
PNO'S	Procedimientos Normalizados de Operación
REF.	Referencia
R.I.S	Reglamento de Insumos para la Salud
SSA	Secretaría de Salud
COSUFAR	Comité Mexicano de sustancias químicas de referencia
NF	National Formulary
FCC	Food Chemical codex
AS	Authentic Substance
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
HEPA	High Efficient Particulate Air
AST	Agar soya tripticaseína
UFC	Unidad Formadora de Colonia
R.A.	Reactivo analítico
Q.P.	Químicamente puro
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
BP	Farmacopea Británica
P/V	Peso/volumen
V/V	Volumen/ volumen
LAL	Lisado de Amebocitos de Limulus

ADH	Producción de arginina de hidrolaza
TRP	Degradación de triptofano a indol
URE	Hidrólisis de urea
GEL	Proteasas
PNPG	B-Galactosidasa
GLU	Asimilación de glucosa
PAC	Asimilación de fenilacetato
ADI	Asimilación de adipato
ODC	Producción de ornitina descarboxilasa
LDC	Producción de lisina descarboxilasa
PAL	Fosfatasa alcalina
LAP	Leucina aminopeptidasa
TDA	Producción de triptofano desaminasa
ESC	Hidrólisis de esculina
VP	Prueba de Voiges-Proskawer
VP1	Reactivo para VP (solución de KOH)
VP2	Reactivo para VP (solución de α -naftol en etanol)
NIT1	Reactivo para NO ₃ (Acido sulfanilico en acido acético)
NIT2	Reactivo para NO ₃ (Dimetil naftalina en acido acético)
GAL	Prueba de galactosidasa
C.F.L.	Campana de flujo laminar
IQ	Installation Qualification
PQ	Performance Qualification
OQ	Operational Qualification

REFERENCIAS REVISADAS

REFERENCIAS REVISADAS

- 1.- Food and Drug Administration (FDA) Guía para las inspecciones de laboratorios de control de calidad Microbiológica de productos farmacéuticos, material recopilado por la Asociación farmacéutica Mexicana, A. C. Julio 1993, pp. 7
- 2.- Ishikawa, K., ¿Qué es el control Total de Calidad? La modalidad Japonesa, Tr. Lu, David J; 2da Ed. Grupo editorial Norma. México 2000 pp. 209
- 3.- Guía para el Control Microbiológico de Medicamentos, Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, CIPAM, Marzo 1992, pp. 64
- 4.- Guía de Procedimientos Adecuados de Limpieza de Material Analítico, Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación CIPAM, México, 1991 pp. 33
- 5.- Guía de Validación de Medios de Cultivo, Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación CIPAM, México, Agosto 1990 pp. 47
- 6.- Norma Oficial Mexicana NOV-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica, publicada en el DOF el 31 de julio de 1998
- 7.- Reglamento de Insumos para la Salud, SSA, publicado en el DOF el 4 de febrero de 1998.
- 8.- 5,19,23,25 NMX-CC-001:1995 IMNC ISO 8402.1994 "Administración de la Calidad y Aseguramiento de la Calidad. Vocabulario".
- 9.- 38 NMX-CC-003:1995 IMNC ISO 9001:1994 "Sistema de Calidad-Modelo para el aseguramiento de la calidad en diseño, desarrollo, producción, instalación y servicio".
- 10.- 15, 17, 18, 24, 30, 35. NMX-CC-7-1-1993/ISO-10011-1 "Directrices para auditar sistemas de calidad parte 1-Auditorías".
- 20, 21. NMX-CC-8-1993/ISO-10011-2 "Criterios de calificación para auditores de calidad"
- 11.- Guías de buenas prácticas de fabricación: Auditorías Técnicas en la Industria Farmacéutica, Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, CIPAM, México, 1997.
- 12.- Programa de control microbiológico ambiental en zonas de producción, Ed. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Madrid. 1996.
- 13.- Kaye, S., Journal of Parenteral Science and Technology, 5, 147-152, 1988.
- 14.- Koneman, E and Roberts, G., Micología práctica de laboratorio, 3ª Ed. Edit. Panamericana, Argentina.
- 15.- Manual del sistema de identificación API, Biomerieux, Francia 2004.
- 16.- www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/micro.html+
- 17.- www.fda.gov/CDER/audiences/iact/pharm.htm

- 18.- De la Rosa Carmen, Ullán Carlos, Prieto Ma. Del Pilar, Mosso Ma. De los Angeles, "Calidad Microbiológica del aire de una zona limpia en una Industria farmacéutica", Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia. Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:
- 19.- www.Infloleg.mecon.gov.ar/txtnorma/dto202-2003-84.htm
- 20.- Guía de Buenas Prácticas de Fabricación, Buenas prácticas de Documentación, 1ª. Edición, Comisión interinstitucional de Buenas prácticas de Fabricación, CIPAM, Méx. 1999.
- 21.- Guía de procedimientos adecuados de laboratorio analítico, Comisión Interinstitucional de Prácticas adecuadas de Manufactura, CIPAM, Méx. 1989
- 22.- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 2000, TOMOS I Y II.
- 23.- www.monografias.com/trabajos/mmbiologia/mmbiologia.shtml
- 24.- Dennis R. Arter., Auditorias de calidad para mejorar la productividad, 3ª. Ed. ASQ Quality Press, USA 2003.
- 25.- USP 24 NF 2002
- 26.- NOM-092-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- 27.- NOM 060-SSA-1-1993 Regulación Sanitaria Para Establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica; Cap 8, México, 1995
- 28.- CFR, Parte 211 Current Good Manufacturing Practice For Finished Pharmaceuticals F.D.A.; EE.UU. 1992
- 29.- Federal Standard No. 209E, Airborne Particulate Cleanliness Classes in Cleanrooms and Clean Zones, September 15, 1988
- 30.- Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program, Technical Report No.13, PDA Environmental Task Force, Volume 44 Number S1 suplement 1990, pp.
- 31.- (1116) Microbiological Evaluation of Cleanrooms and Other Controlled Environments, Pharmacopeial Forum, volume 21, Number 2.1995
- 32.- USP 26 NF 21,2003 pp 1681-1686; 2023-2025
- 33.- IMSS, Norma Métodos Generales de Análisis, determinación de la actividad antimicrobiana, Dic 1996.
- 34.- Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program, Technical report No.13 task force, volume 44number S1, Supplement 1990
- 35.- Fundamental of a Microbiological Environmental Monitoring, Journal of parenteral science and technology, technical report no. 13, volume 44 number S1, 1990
- 36.- Dr. Trinchet Lauzand Lemur, La Calibración y las Buenas Prácticas de Fabricación, Informacéutico vol. 11 No. 1 Marzo 2004, México D.F. pp. 27-36

37.- Guía de Procedimientos adecuados de uso y cuidado de animales de Laboratorio y bioterio, CIPAM primera edición México 1994.