

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

CAMPO 1

ELABORACIÓN DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO REQUERIDOS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS ESTERILES

MEMORIAS DE DESEMPEÑO PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

VIOLETA RAMÍREZ TREJO

ASESOR: MVZ GERARDO CRUZ JIMÉNEZ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida por haberme permitido concluir este sueño

A MIS PADRES: LUISA TREJO TAPIA Y LUIS RAMÍREZ

Por darme no sólo la vida, sino construirme la vida más hermosa que pude tener

Gracias por una vida completa de trabajo, esfuerzo y sacrificios.





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Deseo que no sólo este objetivo, sino cada logro en mi vida lo sientan cómo propio.

A una hermosa e inteligente mujer. Por tu apoyo incondicional y tus consejos. Por meter en mi mente la confianza de creer que lo que se quiere se puede, tú eres la persona que siempre me anima a continuar. Porque en algún momento soñaste en que tus hijos fueran profesionistas y dedicaste tu vida completa en ello, pues lo lograste.

GRACIAS MAMÁ

A un hombre culto e inteligente quien me mostró el valor del esfuerzo diario, de la constancia. Porque adoptaste el sueño de tus hijos cómo tuyo y pusiste toda tu vida en conseguirlo. Por todas esas pláticas y tus valiosos consejos que me mostraron que los impedimentos son oportunidades para crecer.

GRACIAS PAPÁ

A MIS HERMANOS: ERIKA Y LUIS

Por ser mi mejor amiga, mi confidente, mi cómplice y por todo tu apoyo.
A mi compañero de infancia, por toda su genialidad y amor incondicional.
Ustedes siempre han sido mi admirable ejemplo. GRACIAS

A MI ABUELA: CONCEPCIÓN RAMÍREZ

Por ser mi ejemplo de amor a la vida, quien me mostró que la vida no es para sobrevivir sino para vivir plenamente.

A MI ABUELO: PEDRO TREJO

Quien me ha mostrado su apoyo y cariño en todo momento.

A LOS RAMÍREZ:

A todos mis tíos, primas y sobrinos. A la familia que le inyecto a mi vida las mejores y más divertidas vivencias, sonrisas y apoyo. Espero que siempre estemos juntos, porque sólo verlos hace olvidar todos los problemas.

ALOS TREJO:

Por todos esos hermosos momentos, por sus atenciones, cariño y apoyo.

A JUAN PABLO ZAMUDIO CARDOSO

Gracias por tu apoyo, tiempo, esfuerzo y amor incondicional.

A MIS AMIGOS:

Leticia, Dulce, Itzel, Edgar porque forman parte primordial en mi vida. Ya que a pesar de la diversidad de personalidades logramos formar un gran equipo.

Gracias por mostrarme el significado de querer a un amigo sin cuestionarlo.

Triana y Silverio. Por esos agradables momentos en el trabajo. Que me dio la oportunidad de conocerlos y formar una hermosa amistad.

A MIS COMPAÑEROS DE IM. BRULUART:

Por sus enseñanzas y paciencia así cómo la amistad que me brindaron.

Al Profesor Gerardo Cruz Jiménez por la disposición y tiempo que me brindó para concluir este trabajo.
mis sinodales por revisar con toda rapidez y precisión este trabajo. Gracias



**Quiero agradecer a la Institución que no sólo me dio mi formación profesional, sino una serie de valores y principios que forman parte de mi vida cada día y me tatuaron un PUMA en el corazón.
GRACIAS UNAM. FES CUAUTITLÁN**

FINALMENTE:

Gracias a todos quienes me han apoyado y también a quienes me han obstaculizado. Pues me enseñaron que hay que tomar más impulso en el camino para llegar a la meta y fortalecieron mi carácter.

INDICE

CAPITULO I

ÁREAS ASEPTICAS

- 1.1 Características de construcción y operación
- 1.2 Parámetros a controlar en áreas asépticas
- 1.3 Temperatura
- 1.4 Humedad relativa
- 1.5 Flujo de aire
 - 1.5.1 Flujo multidireccional
 - 1.5.2 Flujo unidireccional
- 1.6 Presurización
- 1.7 Filtros HEPA

CAPITULO II

ESTERILIZACIÓN Y DESPIROGENIZACIÓN

- 2.1 Definición
- 2.2 Esterilización por calor húmedo
- 2.3 Esterilización por calor seco
- 2.4 Despirogenización

CAPITULO III

SANITIZANTES

- 3.1 Limpieza y sanitización
- 3.2 Definición de Sanitizantes
- 3.3 Mecanismos de acción
- 3.4 Uso en la industria farmacéutica
- 3.5 Evaluación de sanitizantes

CAPITULO IV

MONITOREOS MICROBIOLÓGICOS EN ÁREAS ASÉPTICAS

- 4.1 Fuentes de contaminación
- 4.2 Monitoreo ambiental
- 4.3 Placa de sedimentación



- 4.4 Evaluación de superficies
- 4.5 Evaluación de personal
- 4.6 Niveles de alerta y niveles de acción
- 4.7 Identificación de microorganismos
- 4.8 Calificación de personal

CAPITULO V

ENSAYOS DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS. PRUEBA DE LAL

- 5.1 Estructura de endotoxinas
- 5.2 Relación estructura- actividad biológica
- 5.3 Fundamento de la prueba de LAL
- 5.4 Métodos de LAL
 - 5.4.1 Método de gelificación
 - 5.4.2 Método turbidimétrico
 - 5.4.3 Métodos cromogénicos
- 5.5 Uso de la prueba de LAL en la fabricación de medicamentos inyectables
 - 5.5.1 Agua de fabricación y material de envase primario
 - 5.5.2 Producto Terminado

CAPITULO VI

- 6.1 Prueba de esterilidad

CAPITULO VII

SISTEMA DOCUMENTAL

- 7.1 Importancia de la documentación
- 7.2 Procedimientos Normalizados de Operación
 - 7.2.1 Definición
 - 7.2.2 Características
 - 7.2.3 Contenido
 - 7.2.4 Índice General



RESUMEN

La fabricación de medicamentos requiere de estrictos controles durante toda la etapa del proceso encaminado a asegurar la calidad del producto fabricado para cumplir con el objetivo de beneficiar al paciente que lo consume. En el caso específico de fabricación de medicamentos parenterales se debe cumplir plenamente con la condición de esterilidad en todas las unidades que contiene un lote, dicha condición de esterilidad depende de gran cantidad de factores y materiales involucrados como materias primas, materiales, instalaciones, equipo y principalmente el personal. La calidad del equipo de trabajo resulta ser la más importante de las herramientas concientizar acerca de la importancia de cada una de las acciones de las personas involucradas garantizará un producto eficiente y segura para el paciente.

Para verificar y llevar controles documentados que respalden la inocuidad de los productos farmacéuticos parenterales se requiere del área de Microbiología Farmacéutica la cuál es la encargada de evaluar el Proceso de fabricación desde las materias primas hasta el Producto Terminado, creando Procedimientos Normalizados de Operación que propongan la técnica adecuada de evaluar basándose en la Normatividad Oficial vigente, en las características y necesidades de la empresa, pero principalmente en la seguridad del paciente ya que en medicamentos parenterales se debe considerar que su aplicación es directa sobre el sistema circulatorio del paciente y una contaminación puede provocar la muerte.

La creación de Procedimientos Normalizados de operación tiene como objetivo cumplir con la Normatividad vigente, la Norma Oficial Mexicana 059 y además documentar cada actividad a realizar con el objetivo de reducir riesgos de equivocación, estandarizar métodos, y unificar la experiencia del personal. Respaldándolo con Prácticas adecuadas de Manufactura que creen documentos prácticos y confiables.



ABREVIATURAS

PAM - Prácticas adecuadas de manufactura

HEPA: High Efficiency Particle Arresting. Recogedor de partículas de alta eficiencia

NOM: Norma Oficial Mexicana

LAL: Lisado de Amebocitos de Llimulus

FDA: Food and Drug Administration

ISO: Organización Internacional de Estandarización

ECC: Comunidad Economica Europea

USP: United Status Pharmacopea

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación

OBJETIVOS

- 1.1 Establecer los puntos mínimos requeridos según la normatividad para el monitoreo en áreas asépticas.
- 1.2 Establecer la importancia de la evaluación de sanitizantes considerando que uno de los puntos determinantes para mantener las condiciones de asepsia dentro del área de envasado de inyectables.



- 1.3 Describir la prueba de esterilidad cómo análisis determinante de la calidad de la materia prima empleada para la fabricación y el Producto Intermedio y Terminado de medicamentos parenterales.
- 1.4 Describir la importancia de la prueba de pirógenos en el análisis de agua empleado en la fabricación de medicamentos estériles y en el Producto Terminado.
- 1.5 Realización de los Procedimientos Normalizados de operación requeridos cómo parte de la evidencia documental del establecimiento de las técnicas requeridas para garantizar el control microbiológico en la fabricación de medicamentos estériles.

INTRODUCCIÓN

La fabricación de medicamentos estériles requiere de gran cantidad de controles microbiológicos que permitan garantizar la esterilidad de cada unidad fabricada, lo que resulta imposible con cada parte que compone un lote de manufactura. El envasado aséptico requiere de establecer controles que permitan detectar cualquier tipo de falla, ya que si esto no ocurre puede salir al mercado un producto que produzca grandes consecuencias para la salud de los pacientes que los consumen.

Por los motivos antes mencionados garantizar la calidad de un medicamento estéril depende del control durante el proceso de manufactura y aplicar las PAM.ís, y a las materias primas, agua, personal e instalaciones involucradas hasta el producto terminado que garanticen su calidad pues es imposible analizar cada unidad fabricada. La prueba de esterilidad establecida por la USP es de un valor muy limitado ya que sólo permitiría detectar cierta cantidad de medicamentos contaminados en un lote producido asépticamente, y es muy baja la probabilidad de muestrear estas unidades.

Lo que significa que el control durante el proceso deben ser los mecanismos primarios a través de los cuales se asegure la esterilidad de productos fabricados asépticamente. Utilizando el manejo de riesgos para evaluar, rediseñar y controlar el proceso de manufactura pueden minimizarse los riesgos asociados con el proceso aséptico. Sin embargo el control real del riesgo sólo puede lograrse sacando a la gente del proceso de envasado aséptico, y actualmente es la propuesta emplear la nueva tecnología incluyen aisladores y sistemas de barrera máquinas de soplado-llenado-sellado y formado-llenado-sellado y sistemas de llenado de viales cerrados. Estos sistemas que excluyen al personal del ambiente crítico de manufactura aséptica, están diseñados con esterilización automatizada, monitoreo y características de control que detectan y reaccionan a las condiciones anormales que podrían comprometer la esterilidad de un producto

CAPITULO I ÁREAS ASEPTICAS

Considerando que la máxima normatividad reconocida en México dentro de la industria farmacéutica es la Norma Oficial Mexicana 059. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. En donde se define área aseptica cómo una zona comprendida dentro de un área limpia, diseñada y construida para minimizar la contaminación por partículas viables y no viables manteniéndola dentro de límites preestablecidos dentro de la cual se encuentra el área crítica aseptica que es la zona dentro del área aseptica en la cual el producto, los recipientes y dispositivos de cierre esterilizados serán expuestos al medio ambiente. Un área aseptica según la sección 2.1.1 de ISO 14644-1 la define cómo un cuarto en el cual la concentración de partículas aerotransportadas sea controladas y el cual se construye y se opera de manera que permita reducir al mínimo la introducción, la generación y la retención de partículas dentro del cuarto y en el cual se controlan otros parámetros relevantes cómo temperatura, humedad y presión cómo requisitos. La designación cómo Área aseptica se conforma también de tres parámetros principales:

- Número de la clasificación expresado cómo clase de la ISO
- Estado de ocupación
- Tamaño de partícula y su concentración relacionada.



Existen ciertas características que debe respetar un área aséptica.

- El acceso a estas áreas se hará a través de esclusas de aire independiente, tanto como el personal, materias primas y materiales.
- Se deberán mantener con un grado de limpieza tal que garanticen las operaciones que son llevadas a cabo y se les suministrara solamente aire que haya pasado a través de filtros de alta eficiencia.
- Las operaciones de preparación de materiales, formulación del producto, llenado y esterilización se realizara en áreas separadas dentro del área limpia clasificada, ubicadas secuencial mente y de forma tal que se garantice un flujo unidireccional de materiales, producto y personal.
- Cada operación de producción exige un nivel de limpieza del ambiente en condiciones de operación con vistas a disminuir el riesgo de contaminación microbiana o de partículas del producto o de los materiales que se estén manipulando.
- Las áreas limpias se diseñaran logrando obtener los niveles de limpieza del aire especificado tanto para las condiciones de reposo como para las condiciones de operación.

Actualmente la NOM 059 establece ciertas características requeridas como parámetros necesarios en áreas asépticas.

1.1 CARACTERÍSTICAS DE CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN

Las Normas de Buenas prácticas de Manufactura indican que cualquier edificio utilizado en la manufactura, procesamiento, empaque o almacenamiento de un medicamento debe ser de un tamaño adecuado, estar diseñado y construido de manera que facilite la limpieza, el mantenimiento y las operaciones apropiadas. Las regulaciones mencionan que:

Todas las áreas deben tener espacios adecuados para ordenar equipos y materiales a utilizar para evitar confusiones entre componentes y en especial en fabricación de medicamentos de administración parenteral evitar movimientos innecesarios dentro del área y crear turbulencias que originen contaminación.

Las superficies deben estar hechas de materiales lisos, que se puedan limpiar fácilmente. No deben existir grietas en las paredes o en los pisos. Todas las esquinas deben tener molduras cóncavas que prevengan la acumulación de contaminantes, tierra y bacterias.

Estas áreas deben considerar tres aspectos principales: la protección del producto, del personal y del medio ambiente.

Su construcción debe considerar las condiciones externas en cuanto a temperatura, humedad relativa, viento, etc. Se debe diseñar de tal manera que el área conserve las condiciones interiores (temperatura, humedad relativa, presión, ningún tipo de contaminación) cualesquiera que sean las externas.

Los materiales de construcción y los acabados sanitarios de unión entre techo, pared y piso deben prevenir la acumulación de residuos contaminantes y facilitar la limpieza. Todas las puertas deben tener sellos del perímetro y barridos del piso para reducir fugas de aire.

-Deben situarse en un entorno que considerándolo junto con las medidas de protección para proteger la fabricación, presente un riesgo mínimo de provocar la contaminación de los materiales o productos.

- Deben mantenerse cuidadosamente garantizando que las operaciones de reparación y mantenimiento no pongan en riesgo para la calidad de los productos.

-Las instalaciones deben limpiarse y sanitizarse con arreglo e instrucciones detalladas en un Procedimiento Normalizado de operación.

-La iluminación, temperatura, humedad y ventilación deben ser adecuadas y no afectar negativamente de manera directa o indirecta al producto.

-Deben tomarse medidas para evitar la entrada del personal no autorizado. Las zonas de producción, almacenamiento y control de calidad no deben utilizarse como control de acceso por el personal que no trabaje en las mismas.



-Cada área debe disponerse preferentemente de forma que la producción pueda realizarse en zonas conectadas según un orden lógico, correspondiente a la secuencia de las operaciones y a los niveles requeridos de limpieza.)

1.2 PARAMETROS A CONTROLAR EN ÁREAS ASEPTICAS

Existen ciertos factores que se deben controlar en las áreas asépticas con el fin de mantener las condiciones adecuadas de fabricación durante el proceso. Estos factores son:

- Acabados sanitarios
- Iluminación
- Número y dimensiones de partículas en el aire
- Temperatura
- Humedad
- Flujo de aire: Velocidad, dirección y distribución en la sala
- Presión
- Esclusas (Acceso controlado)
- Personal calificado

1.3 TEMPERATURA

Las temperaturas que se establecen en Normas Internacionales como la FDA, ECC, ISO fluctúan entre los 20 y 22°C y la NOM (Norma Oficial Mexicana) 059 establece una temperatura de 18 a 25 °C. La temperatura proporciona un área confortable al personal ya que evita la transpiración y por tanto reduce la generación de partículas y las emisiones respiratorias.

El proceso de fabricación es el principal factor que indica la gama de temperatura, para mantener la temperatura del área dentro del intervalo permitido exige una instalación de control y regulación muy sensible ante pequeñas variaciones de carga térmica. Así mismo es necesario que las condiciones climáticas exteriores no influyan en la carga térmica interior, por lo que es usual que el área aséptica se encuentre en el interior de otras salas que ya se encuentran a temperatura constante.

1.4 HUMEDAD RELATIVA

La humedad requerida según la FDA, ECC, e ISO son de 40 a 50% y la NOM 059 establece una humedad relativa de 30 a 65%. Este porcentaje de humedad debe proporcionar estabilidad al producto que se manufactura, así como protección al ambiente del personal que evite cualquier contaminación. El condicionante principal del valor de la humedad es el proceso y la elección de la estética. Para la comodidad del personal suele ser aceptable una humedad entre el 30 y 55%. Los niveles de baja humedad suelen presentar riesgo de deshidratación del personal. La comodidad de éste depende de la humedad, temperatura y del trabajo y métodos utilizados. Además se deben seleccionar las condiciones higrométricas de modo que se tomen en cuenta los requisitos del proceso, este es el criterio especialmente válido para el control de la humedad. El proceso de producto podría requerir las condiciones interiores apropiadas para un proceso en seco, pero esto no puede adecuarse a las condiciones de trabajo como la baja humedad relativa (25- 30%) para la fabricación de productos higroscópicos. Por otra parte hay que considerar que en un cuarto aséptico pueden proliferar rápidamente organismos microbianos si se permite que la humedad relativa sea superior al 55%. Una humedad insuficiente en el aire puede también



ser causa de electricidad electrostática; normalmente la humedad se mantiene por encima del 25% para limitar sus efectos.

1.5 FLUJO DE AIRE

El flujo de aire en un área aséptica se describe frecuentemente por el tipo de modelo empleado. La selección de una configuración de flujo de aire debe basarse en los requisitos de limpieza y en la disposición de equipos durante el proceso.

Por el flujo de aire, este tipo de áreas se pueden agrupar en flujo multidireccional y unidireccional.

En el primero el régimen de movimiento de aire es turbulento mientras que en el segundo es laminar.

1.5.1 FLUJO MULTIDIRECCIONAL

En el flujo multidireccional se trata de diluir la contaminación interior mediante la aportación de aire limpio. Se requiere de una estricta disciplina en cuanto a la vestimenta y el movimiento de los usuarios en el interior de la sala, en el caso del régimen turbulento esa disciplina todavía es mayor en el caso de este tipo de flujo.

1.5.2 FLUJO UNIDIRECCIONAL

En estos sistemas de aire el aire se introduce a velocidad baja y constante recorriendo uniformemente toda la sala y es extraído por el parámetro

opuesto. En realidad el barrido no es totalmente uniforme por la existencia en la sala del equipamiento y personas, pero las trayectorias del aire en el interior de la sala son predecibles con aceptable exactitud, con lo que garantiza la no contaminación de los componentes o productos de fabricación. El recorrido que siguen las capas de aire se diseña en forma que la contaminación producida en el interior sea evacuada sin que se produzca diseminación en la sala y sin que alcance a los componentes de fabricación del producto terminado.

1.6 PRESURIZACIÓN

Es uno de los parámetros de mayor relevancia que tiene su influencia en la clase de limpieza de aire y consecuentemente en la calidad del producto que se fabrique, pues esta directamente relacionado con el control de partículas viables y no viables. En términos generales una diferencia de presión entre una sala limpia y el aire ambiente de 15 pascales es suficiente para eliminar la migración de partículas. Cuando hay dos espacios contiguos, el espacio que deba ser más limpio tiene que mantenerse a una diferencia de presión aproximada de 15 pascales con respecto a la zona contigua, análogos incrementos de diferencia de presión sin aplicables a cada una de las salas sucesivas. El máximo valor de presión estática debe ser de 45 pascales para evitar problemas mecánicos con la estructura de obra civil. La alta presión puede provocar también ruido cuando se producen fugas de aire a alta velocidad en la sala limpia a través de muchas pequeñas aberturas. El gradiente de presión en exceso de 25 Pa puede dificultar la apertura y cierre de las puertas. La presurización de una sala se realiza equilibrando los caudales de aire de suministro y retorno para que haya una sobrepresión o una infrapresión; la diferencia entre los caudales de aire de suministro y retorno constituye la fuga encontrada en la sala. Esta fuga tiene lugar por las puertas, escotillas y otras aberturas (Túnel de esterilización).

1.6 CALIDAD DE AIRE FILTROS HEPA

Los filtros HEPA fueron diseñados específicamente para proteger el sistema respiratorio del ser humano, es un filtro de alta eficiencia en el control de partículas suspendidas. Los filtros HEPA también son conocidos como filtros absolutos debido a su eficiencia.



Los filtros HEPA fueron desarrollados durante la segunda guerra mundial por la Comisión de Energía Atómica y fue diseñado para remover y capturar del aire partículas de polvo radioactivas en laboratorios de investigación donde pudiesen escapar y dañar a los investigadores. Actualmente los filtros HEPA son reconocidos por la Environmental Protection Agency como el método probado más reciente para limpiar el aire. El filtro HEPA retiene y filtra todas las partículas del aire desde un tamaño de 0.3 micras con una eficiencia de 99.97%.

Actualmente la NOM-059 establece una cantidad de partículas viables de 3500 de un tamaño de 0.5 micras en áreas asépticas y asegurar la calidad del producto, para cumplir con dicha condición es necesario el uso de filtros HEPA, los cuales se encargan de filtrar el aire con una elevada eficiencia de retención de partículas creando un flujo laminar dentro del área, este concepto implica proveer una masa continua de aire limpio al área. Esta masa esta continuamente moviéndose en la misma dirección, desplazando los contaminantes liberados durante el proceso de manufactura previniendo de esta forma su eliminación dentro de la fabricación y envasado de medicamentos estériles.

CAPITULO II ESTERILIZACIÓN Y DESPIROGENIZACIÓN

2.1 DEFINICIÓN

Cualquier instrumento, material requerido tanto para los procesos de fabricación como para el muestreo debe ser estéril. La esterilización consiste en liberar cualquier objeto, superficie o medio por remoción o muerte de todos los microorganismos que los contaminen ya sea en estado vegetativo o esporulado.

Dentro de la industria farmacéutica cumplir con esta condición resulta fundamental para la manufactura de medicamentos parenterales, comúnmente se emplean la esterilización por medios físicos empleando esterilizadores por calor húmedo y calor seco.

2.2 ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO AUTOCLAVE.

La esterilización con vapor bajo presión se lleva a cabo a temperaturas entre 108 y 147°C. Seleccionando la temperatura correcta y el ciclo de tiempo se puede esterilizar una vasta variedad de materiales por este método; tal como material de curación, instrumentos, equipo de laboratorio, medios de cultivo y productos farmacéuticos.

El principio del esterilizador con vapor o autoclave, es que el agua hierve cuando su presión de vapor iguala a la de la atmósfera que la rodea y si aumenta la presión dentro de un espacio cerrado, así también aumenta la temperatura de ebullición del agua, arriba de 100 ° C. Si se continúa el calentamiento del agua en ebullición bajo presión, absorberá calor en forma latente hasta que se evapore. Este vapor se refiere que esta en una fase límite y tiene la misma temperatura que el agua en ebullición. Después de formado el calor absorbido es conocido como calor latente de vapor.

Cuando el vapor entra en contacto con superficies más frías, cede su calor y se condensa en agua. La caída de presión resultara en más vapor que será aplicado a esa área, hasta que la temperatura de condensación sea igual a la de vapor.

Es la contracción de volumen en el punto de condensación lo que da origen a la penetración del vapor a través de toda la carga y a la liberación de calor latente que destruye cualquier microorganismo que se presente al coagular sus proteínas.

Cuando se esterilizan soluciones acuosas por este método, las temperaturas usadas oscilan entre 108 y 126°C. El calor es conducido a través de las paredes del recipiente sellado, hasta que la temperatura del líquido esta en equilibrio con la del vapor y así los microorganismos serán destruidos nuevamente por coagulación con calor húmedo. Si los líquidos no son acuosos, como la parafina, el método es



satisfactorio, ya que resulta comparable con la esterilización en seco con la desventaja que no se sobrepasan los 126°C.

Los equipos comúnmente empleados para este fin, son las autoclaves que emplean generalmente una presión de una atmósfera por encima de la presión atmosférica, lo cuál corresponde a una temperatura de 120°C. El tiempo de exposición depende del volumen del líquido, de manera que para volúmenes pequeños se utiliza 120°C y un tiempo de 20 minutos, si los volúmenes son mayores deben alargarse los tiempos de tratamiento.

Para determinar la eficiencia de la esterilización con calor húmedo se usan las esporas del grupo *Bacillus* y la especie de *Bacillus stearothermophilus* es el microorganismo de prueba. Este bacilo es termófilo y se desarrolla a una temperatura de 55 a 60°C y sus esporas deben ser expuestas a una temperatura de 121°C durante 12 minutos para ser muertas.

Se impregnan tiras de papel con 10^6 esporas, se secan a la temperatura del cuarto y se colocan en sobres de papel. Estos sobres se acomodan en distintas partes de la carga y después de esterilizar, las tiras se siembran en un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de las esporas y luego se incuban para comprobar la esterilidad a 55°C durante 5 días.

Existen en el mercado también indicadores químicos estos son muy convenientes y proporcionan una indicación rápida del grado de eficiencia de la esterilización, al cambiar de color, basado en la segura combinación del tiempo y temperatura que se requiere para que ocurra la reacción. Los tubos que contienen estos indicadores se llaman tubos de Browne y los cambios de color indican la condición del proceso: rojo-peligro, amarillo – precaución, verde – esterilización satisfactoria.

También se emplea la cinta testigo que es una tela adhesiva que resulta conveniente para sellar paquetes, cajas y está impregnada con un colorante que cambia del blanco a varias tonalidades desde pardo hasta negro, dependiendo del grado de calentamiento que ha sufrido. Es útil para indicar que un objeto ha sufrido un proceso de calentamiento pero no debe emplearse como único indicador de esterilidad.

2.3 ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO

La esterilización con aire caliente (o esterilización en seco) se usa principalmente para esterilizar material de vidrio y otros materiales sólidos estables al calor.

Cuando se seleccionan objetos para la esterilización en seco, se debe tener en cuenta que se logran temperaturas de 160 a 180°C que puede destruir diversos materiales.

El aire caliente es un mal conductor del calor y penetra lentamente a los objetos durante la esterilización en seco. El tipo convencional de esterilizador de aire caliente, con los elementos térmicos instalados en las paredes cuenta con un ventilador para asegurarse de la distribución uniforme del aire caliente y para evitar la formación de bolsa de aire. Se debe considerar no saturar la cámara y acomodar el material de tal forma que permita la circulación del aire entre cada objeto de la carga.

Para determinar la temperatura y tiempo requeridos para cada carga mediante un ciclo de esterilización debe considerarse que la esterilización completa se lograra cuando cada objeto de la misma ha sido calentado suficientemente para destruir todos los microorganismos esporulados y no esporulados. El tiempo necesario para que el calor penetre en cada objeto se le llama tiempo de penetración del calor. El tiempo requerido para asegurar que el calor penetre en cada objeto se le llama tiempo de penetración del calor. El tiempo requerido para asegurar que todas las esporas bacterianas retinientes hayan sido destruidas es el tiempo de retención, sumando todos estos tiempos se le llama ciclo de esterilización.

Los hornos pueden emplear varios ciclos de esterilización dependiendo del tiempo y temperatura. La carga debe ser preparada en un área controlada como acceso limitado, niveles reducidos de materia particulado, calidad de aire conocida, tipo de vestimenta específica, cofia y cubrebotas.

La USP recomienda la validación de los ciclos de esterilización para componentes termoestables empleando una probabilidad de supervivencia microbiológica de 10^{-12} para esporas de *Bacillus subtilis*.



También se emplea como control las esporas de *Clostridium tetani* toxigénica como prueba microbiológica. Se colocan en un sobre de papel tiras de papel secante impregnadas de esporas de 10^6 y se incluyen en los bultos seleccionados o se puede preparar un paquete para prueba con una jeringa en un recipiente de aluminio.

Una vez terminado el tiempo de esterilización las tiras se siembran en medios con tioglicolato o con carne y se incuban buscando esterilidad bajo estrictas medidas para anaerobiosis durante 5 días a 37°C .

Hay un tubo disponible de Browne para testigo de la esterilización con calor seco y es un medio muy satisfactorio para uso rutinario. Un ciclo de esterilización satisfactorio produce virajes de color verde después de 60 minutos de esterilización a 160°C o después de 115 minutos a 150°C .

2.4 DESPIROGENIZACIÓN

El proceso de despirogenización se emplea en componentes termoestables, contenedores de vidrio, equipo de metal, para que finalmente se tenga un producto parenteral libre de pirógenos.

El equipo empleado para el medio que provee el calor seco debe ser validado con el fin de asegurar que el sistema es capaz de proveer componentes estériles o despirogenizados de una manera reproducible

La USP recomienda la validación de los ciclos de despirogenización de los cuales ciertos utensilios o componentes deben ser cargados con un mínimo de 1000 unidades de endotoxinas purificada (UE). El lisado de Limulus de amebocitos (LAL) como prueba de un método específico para probar el nivel de endotoxina.

CAPITULO III SANITIZANTES

3.1 LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN

La limpieza se define como el grado de aceptación de sustancias y partículas no deseables cuyo efecto sea adverso al producto o proceso. La limpieza y sanitización son los pasos determinantes para la calidad de un producto farmacéutico, que aunque no son un paso en la fabricación que no es productivo, ni en sentido estricto farmacéutico. Sin embargo su planeación, ejecución y validación son pasos importantes para la producción de medicamentos que cumplan con la normatividad. Para establecer el procedimiento de limpieza se debe considerar reducir los residuos de un producto por debajo de los límites establecidos con el fin de no afectar la calidad y seguridad de otro producto elaborado en el mismo equipo. Posterior a una limpieza se debe aplicar una sanitización cuyo objetivo es la remoción, destrucción o inactivación de microorganismos de superficies y objetos no animados, ya que la contaminación microbiológica puede destruir o comprometer la integridad y las características de un producto.

La regla fundamental de la limpieza es no añadir suciedad al área cuando se limpia microbiológicamente se debe evaluar la superficie que ha sido limpiada y sanitizada de acuerdo a un Procedimiento previamente establecido. La limpieza del área aséptica constituye uno de los factores primordiales para tener al área dentro de especificaciones complicado por la limpieza de áreas de difícil acceso como pisos, techos, mesas, o ventanas, y la maquinaria y equipo empleado que además de requerir condiciones de esterilidad debe cumplir con condiciones de apirogenicidad.

La limpieza se debe realizar con detergentes que posean ciertas propiedades:

- Reducir la tensión superficial a las superficies húmedas
- Tener un componente acuoso, un solvente de hidrocarburo o un componente alcalino para ayudar a disolver sustancias iónicas, aceites y grasas
- Evaporar rápidamente
- Dejar un residuo mínimo después de la evaporación
- Contener un mínimo de metales, halógenos y sustancias orgánicas volátiles
- Tener un olor aceptable



-No ser toxico o perjudicial para el ambiente

3.2 SANITIZANTES

Una sanitizante es un agente químico que destruye o inhibe el crecimiento o actividad de los microorganismos, poseen diversa composición química:

- Sales cuaternarias de amonio
- Compuestos clorados
- Compuestos fenólicos
- Aldehidos
- Alcoholes
- Cresoles
- Metales pesados
- Compuestos cuaternarios de amonio

3.3 MECANISMOS DE ACCIÓN

En el área de microbiología se debe evaluar el rol anual de sanitizantes que va a ser empleado para las áreas de producción considerando el mecanismo de acción de cada uno e intercalarlos de tal manera que evite la resistencia de la microbiota normal a su efecto. Entre los principales mecanismos de acción se encuentran:

- COAGULACIÓN DE PROTEINAS

La mayoría de las proteínas de la célula son enzimáticas y existen en un estado coloidal fino y disperso. Si se provoca la precipitación y la coagulación de las proteínas, éstas dejan de funcionar y la célula muere.

- RUPTURA DE LA MEMBRANA CELULAR

La membrana celular actúa como barrera selectiva, permitiendo el paso de algunas soluciones, pero no de otras, las cuales son absorbidas por las células. Se han localizado muchas enzimas en la membrana, tales como los pigmentos respiratorios de los citocromos y el grupo conocido como permeasas, que están involucradas con el transporte activo de los metabolitos.

Las sustancias que se concentran en la membrana celular y que son absorbidas por la célula pueden alterar las propiedades físicas y químicas de la membrana interfiriendo con su funcionamiento normal. Esto puede provocar la inhibición o la muerte de esa célula.

- REMOCIÓN DE LOS GRUPOS SULFIDRILLO LIBRES

Muchas de las proteínas enzimáticas de una célula contienen cisteína y cadenas laterales que terminan en -SH (grupos sulfhidrilo). Estas enzimas no pueden funcionar a menos que los grupos sulfhidrilo permanezcan libres y reducidos. Si los grupos sulfhidrilo son fijados (por ejemplo por una agente oxidante) le ocurre a la célula un daño generalizado que puede terminar en su muerte.

- ANTAGONISMO QUÍMICO

Las enzimas realizan su acción catalítica en virtud de su afinidad por sus sustratos naturales. Si un compuesto se asemeja mucho a un sustrato en sus aspectos esenciales el sustrato real se ve inhibido.



afinidad por ese compuesto. Si la afinidad es suficientemente fuerte, el compuesto substituirá al sustrato normal de la enzima y evitara que la reacción normal tenga lugar, inhibiendo así la reproducción de la célula.

De acuerdo a su composición química se pueden establecer mecanismos de acción de cada sanitizante:

Fenol y sus derivados: Grupo OH en el anillo bencénico, su uso es limitado.

Ejemplos: hexaclorofeno y clorhexidina

Alcoholes: Se usan ampliamente cómo antisépticos. Principalmente el etanol e isopropanol. En una concentración del 70% es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica para la sanitización de superficies. El isopropanol es más efectivo, más toxico y posee cómo ventaja que elimina endosporas bacterianas.

Cresoles: Efectivos porque persisten y son activos en presencia de materia orgánica uso hospitalario y domestico.

Ejemplo: O-fenilfenol.

Peroxido de Hidrógeno: Oxidante antiséptico débil en solución al 3% y cómo desinfectante en instrumentos médicos.

Halógenos: Yodo (antiséptico), cloro (desinfectante)

Metales pesados: Sales de mercurio, sales de plata y plata coloidal son usados cómo antisépticos y desinfectantes. Inhiben actividad enzimática y desnaturalizan proteínas.

Aldehídos: El formaldehído es normalmente empleado en áreas asépticas con elevados procedimientos de seguridad ya que es cancerígeno y reacciona con proteínas celulares de RNA y DNA. Su efectividad es elevada debido a que una concentración del 37% mata todo tipo de microorganismos incluyendo endosporas. El glutaraldehido se usa para esterilizar instrumentos quirúrgicos sensibles a la esterilización por calor.

Jabones: Sales de sodio o potasio de ácidos grasos de cadena larga. Depresores de la tensión superficial, aumentan su acción bactericida al incrementar su temperatura, rompen las membranas celulares y aumentan permeabilidad. Son empleados ampliamente en limpieza y la eliminación de microorganismos se lleva a cabo por eliminación mecánica.

Detergentes: Contienen en su estructura cadenas de hidrocarburos, esterole y un anión o catión hidrófilo. Elevando la temperatura mejoran su actividad, se debe tener cuidado de no emplearlo en combinación con jabones ya que estos inhiben su acción. Rompen las membranas celulares al combinarse con líquidos y proteínas. Poseen propiedades bactericidas.

Compuestos de amonio cuaternarios: Los cationes substituyen al amonio y son más activos en soluciones alcalinas.

Ácidos orgánicos: El ácido sulfúrico destruye la membrana celular y paredes celulares de uso limitado ya que es corrosivo.

Ácidos orgánicos: Acético, benzoico, bórico. Presentan poca ionización por lo que las moléculas no disociadas se combinan con los constituyentes protonámicos. Son usados cómo conservadores y en asepsia moderada.



Álcalis: Sosa cáustica (NaOH), Na_3PO_4 , los iones OH^- destruyen las membranas y paredes celulares.

3.4 USO EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Dependiendo de su naturaleza química, mecanismo de acción y riesgo de empleo se pueden utilizar:

SANITIZANTE	EMPLEO INDUSTRIAL
HALOGENOS Hipoclorito Cloro gaseoso Iodoformos	Sistemas de agua Equipos Superficies de trabajo
Cuaternarios de amonio	Equipo Interior de instalaciones Superficie de trabajo
Fenol y relacionados	Interior edificios Desinfección de piel
Alcoholes	Superficie de trabajo Equipos
Aldehidos	Sistema de agua Equipos Áreas del proceso aséptico
Oxido de etileno	Materia prima y Producto terminado empacado

3.5 EVALUACIÓN DE SANITIZANTES

Se deberá contar con un Procedimiento Normalizado de Operación para evaluar la efectividad de los sanitizantes y considerar el mecanismo de acción de cada uno para establecer un manual que impida la resistencia de los microorganismos a cierto sanitizante específico. El reto debe involucrar a microorganismos del cepario de Microbiología pero principalmente microorganismos encontrados habitualmente en las áreas de fabricación.

Una vez establecido el rol de sanitizantes se debe capacitar al personal que labora en las planta de producción para que conozca todos los aspectos importantes acerca del uso de cada uno:

- Concentración
- Tiempo de exposición
- Temperatura
- Condiciones de almacenamiento
- Naturaleza del microorganismo



- Fase de crecimiento
- Número de microorganismos
- Presencia de materias orgánicas

El punto primordial para asegurar la eficacia que cada sanitizante ofrece es capacitar al personal acerca de la manera adecuada de preparar cada uno y como emplearlo, hacer énfasis en aspectos cómo:

- Utilizar agua calidad inyectable
- Prepararlos en áreas controladas
- Documentar su preparación (pesadas, volúmenes, etc.)
- Orden de adición
- Ajuste de pH en caso que se requiera
- Personal entrenado
- La dilución de uso debe sujetarse a pruebas microbiológicas y análisis químico
- Verificar cada lote que ingrese
- Cuando se requiera filtrar los sanitizantes
- Almacenamiento, tiempo de caducidad una vez empleado y evaluado por el área de Microbiología.

CAPITULO IV MONITOREO AMBIENTAL DE ÁREAS ASÉPTICAS

4.1 FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Existen factores principales a controlar durante los procesos asépticos en los cuales se debe tener mayor control para garantizar mantener las condiciones de asepsia, teniendo siempre en mente las fuentes potenciales de contaminación:

- Personal: Debe tener presente la importancia del trabajo que va a realizar y tener el serio compromiso de trabajar con un alto desempeño y calidad, gozar de buena salud y poseer hábitos de limpieza personal.
- Aire: El aire es importante para mantener las condiciones de presión dentro del área antes descritos y mantener el ambiente aséptico. Debe ser un aire filtrado para reducir en un 99.9% el riesgo de contaminación.
- Instalaciones: Deben tener un diseño especial ya que deben evitar que se acumule polvo y disminuir al máximo la generación de partículas y las superficies deben facilitar su limpieza.
- Agua: Debe ser un agua preparada a través de agua potable a la que se le dan tratamientos adecuados seguidos de un proceso terminal de destilación. Es el tipo de agua utilizada cómo vehículo o solvente en la fabricación de productos farmacéuticos inyectables, también se usa en los últimos pasos de la limpieza de áreas o equipos. El sistema involucrado para la circulación o distribución del agua debe prevenir en todo momento la contaminación microbiana, y la formación de endotoxinas bacterianas.

El objetivo principal de la fabricación de medicamentos inyectables es cumplir con la calidad de cada una de las unidades fabricadas, garantizarlo resulta muy complicado, debido a que no es posible analizar todas las unidades envasadas para detectar algún tipo de contaminación.

El desafío principal en el proceso aséptico es mantener un nivel consistentemente alto de control microbiano en el medio. En los ambientes con personal, este es un desafío sustancial ya que el personal, incluso quienes tienen buenas prácticas asépticas mientras trabajan y se mantienen limpios en general, medida entre las intervenciones continuamente desprenden microorganismos en tasas relativamente altas (Entre 10^6 microorganismos por hora) y los materiales de vestir utilizados deben ser cuidadosamente seleccionados para excluir estos organismos de los elementos estériles que están siendo procesados. La operación y el manejo apropiado de los medios asépticos para minimizar la contaminación microbiana es difícil y demandante debido a ciertas situaciones cómo:



- Un exceso de confianza en el armado manual y las manipulaciones humanas en los cuartos asépticos, más que la confianza en la automatización del equipo y los sistemas cerrados durante los procesos asépticos.
- Debido a una ausencia general de automatización, la preparación y operación del equipo de proceso requiere de intervenciones del personal para casi todas las actividades.
- Un movimiento de aire insuficiente e inapropiada mente optimizado.
- Una escasez de sistemas de proceso capaces del mantenimiento y ajuste de equipo.
- Ingreso de materiales que no pueden esterilizarse y se ingresan pobremente sanitizados.
- El equipo y los componentes son de calidad inadecuada y requieren una frecuente actividad humana para corregir los atoramientos, los paros y otros errores de operación.

4.2 MONITOREO AMBIENTAL

El monitoreo microbiológico son elementos esenciales dentro del control del proceso aséptico. El monitoreo o vigilancia microbiológica es la medición u observación programada que debe realizarse en los diversos puntos de un área ya que son elementos esenciales de un programa de control que proporciona datos para verificar los factores que contribuyen en los procesos de contaminación y una vez identificado el problema instituir medidas apropiadas y evaluar su eficacia. La vigilancia ambiental microbiológica del área debe incluir monitoreo de superficies, exposición de placa y muestreo de aire. Se debe de considerar que este monitoreo no interfiera con el proceso de fabricación o envasado del producto. De los resultados obtenidos en estos monitoreos se deben establecer los límites críticos los cuáles son niveles o tolerancias establecidas en base a la Normatividad en el caso de la industria farmacéutica la NOM-059 establece estos valores los cuales por ningún motivo deben superarse para asegurar un control efectivo.

La vigilancia ambiental de las áreas limpias adyacentes al área de envasado y el área aséptica de envasado de productos estériles se debe realizar escribiendo un programa escrito aprobado por Aseguramiento de Calidad, considerando los siguientes aspectos:

- Se realizara la vigilancia ambiental de las áreas limpias durante la producción de acuerdo a la clasificación y al tipo de operación que se efectuó.
- La vigilancia ambiental microbiológica de las áreas tendrá en cuenta el muestreo de aire, superficies y personal, empleando métodos volumétricos y por placa expuesta para el aire e hisopado y placa de contacto para el muestreo de superficies.
- Se debe realizar el muestreo de superficies y del personal después de las operaciones críticas. También se debe evaluar una vigilancia microbiológica adicional para las operaciones que no pertenecen a la producción, por ejemplo una operación de mantenimiento, limpieza profunda o una actividad de validación.
- Los resultados de la vigilancia microbiológica se deben cómo información relevante durante la evaluación de la documentación del lote para liberar el producto.
- Se deben establecer límites de alerta y acción para efectuar la vigilancia microbiológica de las áreas limpias en condiciones de operación sobre la base de los estudios de validación y los resultados históricos de la vigilancia ambiental microbiológica.
- En caso de rebasar los límites de alerta y acción, se debe establecer una acción.

La relevancia del monitoreo ambiental se encuentra en obtener estos resultados así como el uso de dichos datos y aplicar medidas correctivas con el fin de erradicar el problema y mantener bajo control el proceso y evitar en toda medida la contaminación del producto.

El monitoreo ambiental tiene por objetivo:

- A) Antes de fabricar.
 1. Evaluar la efectividad del programa de limpieza y desinfección.
 2. Conocer el perfil microbiano.
- B) Durante la fabricación
 1. Determinar el aumento del contenido microbiano.



2. Evaluar si ha ocurrido migración de microorganismos de área adyacentes.
3. Proporcionar datos que soporten investigaciones para la disposición de productos.

C) Después de la producción

1. Evaluar la contaminación a partir del proceso de fabricación.
2. Colectar datos para soportar investigación.
3. Validar apropiadamente los parámetros operacionales.

Existen ciertas partes durante el proceso en que se requiere un monitoreo ambiental muy estricto con el fin de verificar que el área se encuentra en condiciones adecuadas para la fabricación:

- Siempre que se produzca un resultado fuera de límites establecidos
- Cuando el área o equipo se haya sometido a algún tipo de mantenimiento.
- Después de un cambio de especificaciones en la instalación.
- Después de un periodo prolongado de inoperatividad de la instalación

4.3 PLACA DE SEDIMENTACIÓN

Este monitoreo es un tipo de muestreo pasivo, es una de las técnicas más comunes para determinar la cantidad de microorganismos, es un tipo de monitoreo pasivo que se realiza por un tiempo aproximado de 30 a 60 minutos, mediante este método no es posible cuantificar la cantidad de microorganismos presentes en el área, ya que no es posible determinar el volumen de aire muestreado. La fuerza con la que se depositan las partículas es la gravedad y tamaño de la misma. La velocidad aproximada de deposición es de 0.462 cm/seg.

Es necesario realizar un cálculo del tiempo de exposición requerido a través de la siguiente fórmula₂

$$T = (N \times 17) / (a \times c)$$

T = Tiempo de exposición en horas

N = Número de bacterias que se requiere sea detectado

A = Área de la placa m³.

Existen ciertas consideraciones de comportamiento al realizar este tipo de monitoreo dentro del área aséptica:

- Las placas deberán exponerse con cierta trayectoria lógica desde los puntos internos hacia los externos.
- Procurar trasladar todas las placas hacia el punto cercano a monitorear con el fin de evitar movimientos innecesarios.

El sistema Ingles describe una práctica formula para calcular el número mínimo de placas requeridas en base al área total a muestrear.

$$\text{No placas} = \text{Área en ft}^2 / 25$$

4.4 EVALUACIÓN DE SUPERFICIES

Se muestrean superficies críticas estas son todas aquellas superficies que están en contacto con el producto.

- Producto Intermedio
- Envases primarios
- Bandejas de liofilización
- Bombas de llenado
- Inyectores

El tipo de superficies a elegir para ser muestreadas pueden ser:

- Techos
- Paredes
- Ventanas



- Puertas
- Equipo
- Repisas y mesas
- Pisos
- Personal

Existen dos técnicas principalmente para la evaluación de superficies puede ser con placa tipo rodac o hisopo. Las placas de contacto tipo rodac contienen agar es estado sólido formando un menisco cóncavo que permitirá hacer contacto con la superficie a evaluar, estas placas deben ser aprobadas por el área de Microbiología y verificar su crecimiento mediante pruebas de promoción de crecimiento establecidas en un Procedimiento. Estas placas de contacto tipo rodac contienen agar enriquecido para crecimiento de bacterias o levaduras y hongos filamentosos, estos rodac se encuentran rotulados con la medida de muestreo 25 cm², únicamente se debe elegir la superficie a muestrear y presionar una sola vez la superficie del agar de manera que haga contacto total con la superficie; la placa no debe presionarse demasiado o girarse sobre la superficie a ser muestreada ya que se puede deteriorar el agar y dejar residuos sobre la superficie muestreada, lo que implicaría que el muestreo contamine el área, cómo medida de seguridad se debe limpiar con un lienzo estéril y especial para áreas asépticas, que no desprenda partículas, este lienzo debe ser humedecido con alcohol isopropílico estéril y apirogénico, y limpiar la superficie después del muestreo.

El muestreo por hisopo se realiza en superficies de difícil acceso o de bordes irregulares, se deben emplear hisopos estériles de fibra poliéster que no desprendan partículas (Tamaño 0.5 cm por 2 cm sobre un palo aplicador de 12 a15 cm). Se debe rotar lentamente el hisopo humedecido sobre la superficie, y tirar el hisopo en movimientos lineales estrechamente paralelos dentro de la apertura de una plantilla especial y estéril con un tamaño de 25 cm² para lograr una acción de trasquileo entre la superficie y el hisopo, romper el segmento de hisopo con el que se tuvo contacto. Se debe colocar el hisopo en una líquido de enjuague de volumen conocido y estéril puede ser solución reguladora pH 7.0. Posteriormente esta muestra debe ser sembrada en partes iguales en un Agar de enriquecimiento para hongos filamentosos y levaduras y otro para bacterias. Esta técnica tiene como ventajas que es un método útil en gran parte de superficies, económico, se pueden muestrear áreas bien definidas, pero deben establecerse claramente los puntos de muestreo ya que es una técnica muy invasiva.

La Norma Oficial 059 establece cómo Límite permisible 1 UFC /huella.

4.5 EVALUACIÓN DE PERSONAL

Las personas involucradas en la fabricación de medicamentos estériles deben ser elegidas muy meticulosamente y cumplir con ciertas características básicas para asegurar la calidad del producto.

- Aseo diario y baño antes de ingresar a un área aséptica.
- Control médico
- Físicamente sano
- Usar ropa limpia y exclusiva del área de fabricación, la ropa usada en el exterior no debe ser producida en las áreas limpias, se deberá contar con Procedimientos rigurosos y claramente definidos de recontaminación.
- No usar maquillaje en las áreas de producción
- Lavarse las manos después de tener contacto con el medio externo
- No ingresar ningún tipo de alimento o comida a las áreas de producción
- Ingresar el número mínimo de personas, cualquier tipo de inspección y control deberá realizarse desde exterior.
- El comportamiento en un área aséptica deben ser moderados, evitando movimientos innecesarios, rápido y bruscos
- No debe sentarse o hincarse en el piso
- Evitar recargarse en paredes y no tocar su uniforme



-Cualquier persona que requiera ingresar a un área aséptica ya sea de parte de producción o control de calidad deberá ser calificada en la técnica de vestido y conocimientos básicos de comportamiento en el área aséptica.

La fuente más grande de partículas autotransportadas en un área aséptica es el personal, que genera partículas viables y no viables. Una persona que camina con la ropa normal genera cerca de 13,500 partículas por segundo de 0.5 micras, mientras que una persona que camina cuidadosamente con uniforme estéril y tiene una conducta apropiada dentro del área con movimientos pausados, genera cerca de 1000 partículas por segundo estas partículas pueden incluir escamas de la piel, pelo, partículas generadas al vestirse, la transpiración y emisiones respiratorias.

El muestreo del personal debe realizarse en puntos estratégicos y posibles de contaminación durante el proceso de envasado con el fin de verificar que el uniforme se mantiene en todo momento estéril y se están aplicando adecuadamente los Procedimientos de vestido y las Buenas prácticas de Manufactura durante el Proceso de envasado.

El muestreo del personal se realizara con placas de contacto tipo rodac en donde una vez vestida y dentro del área la persona a evaluar debe permanecer con los brazos extendidos junto al cuerpo. Se debe tomar la placa de contacto previamente rotulada con las iniciales de la persona a monitorear así cómo el área asignada y proceder cómo se describió anteriormente en el monitoreo de superficies.

La importancia del personal en el proceso aséptico es ampliamente reconocida. Y cada industria debe poner considerable atención en la competencia de los operadores. Todas aquellas actividades requeridas para calificar la competencia de los operadores cómo:

- Programas de capacitación
- Evaluaciones supervisadas para certificación del vestido
- Monitoreo del personal
- Simulación del proceso

Aunque todas estas evaluaciones son importantes ninguna puede soportar verdaderamente las capacidades del operador en todo momento y en cada producto en el que este involucrada su participación.

Por lo que el medio más confiable de evaluar el comportamiento aséptico es la observación frecuente por parte de los supervisores, el entrenamiento constante, pero principalmente concienciar al personal acerca de la repercusión de su trabajo en la salud y la vida de los pacientes.

4.6. NIVELES DE ALERTA Y NIVELES DE ACCIÓN

Los niveles de alerta son valores que al ser excedidos indican que el proceso puede haberse desviado de sus condiciones normales y de operación, son una alarma y no necesariamente requieren de una acción correctiva, siempre y cuando se ponga atención sobre los puntos en que posiblemente se pudo haber fallado durante el proceso y evaluar en que forma se pudo haber puesto en peligro la calidad del producto.

Los niveles de acción son alertas que se dan en el momento de ser excedidas las especificaciones que marca la Normatividad NOM-059, indican que el proceso se ha desviado de sus condiciones normales de operación.

El rebasarlo implica tomar una acción correctiva para que el proceso retorne a sus condiciones normales de operación. Así cómo un muestreo riguroso del producto para verificar su calidad y descartar la posibilidad de contaminación en el producto terminado.

4.7 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Una vez que se rebasan los niveles de acción se debe dar seguimiento a la identificación de cada microorganismo encontrado para conocer el origen de la misma y poder erradicarla, así mismo analizar si los microorganismos encontrados son en más de un área de fabricación que nos puedan dar idea de la forma de ingreso del microorganismo.



Se debe conocer si el tipo de microorganismo es parte de la biota normal del cuerpo humano, ya que estos microorganismos se encuentran normalmente en el ambiente. Este tipo de microorganismos es conocido frecuentemente como microbiota. La identificación de cada microorganismo debe incluir desde funciones específicas del género como una serie de pruebas bioquímica que establezcan la especie.

4.8 CALIFICACIÓN DEL PERSONAL

El personal es la principal fuente de contaminación microbiana, para el control óptimo de riesgo de contaminación en el proceso aséptico, debe reconocerse que las intervenciones por el operador en el ambiente crítico siempre aumenta el riesgo de contaminación en un microbiano en un ambiente estéril. La importancia del personal en el ambiente aséptico debe ser muy reconocida y la industria debe poner en consideración la competencia de los operadores. Todas las evaluaciones al personal desde la calificación del personal, evaluaciones supervisadas para certificación del vestido, monitoreo continuo se deben llevar a cabo para establecer que los operadores son competentes en las operaciones asépticas. Establecer una evaluación completa de cada persona que pretende ingresar a un área aséptica permitirá de alguna manera comprobar la capacidad de un operador para llevar a cabo una acción en particular con éxito, y principalmente que tenga en mente en todo momento no realizar ninguna actividad que ponga en peligro la integridad del producto.

El área de control en proceso en apoyo con Microbiología serán los encargados de establecer los parámetros requeridos para la calificación del personal que ingrese a las áreas asépticas, determinando si este cumple apropiadamente no sólo en una técnica aséptica de vestido evaluar también mediante cuestionamientos si conoce los conceptos de comportamiento en el área.

Entre los lineamientos requeridos para elegir al personal que ingresara a las áreas asépticas:

- Personal que no padezca hipertensión, hipotensión o algún tipo de desorden hormonal
- En la selección del personal propuesto para ingresar a áreas asépticas, el aspirante deberá mostrar a través de un certificado su nivel escolar.
- Se restringirá el área aséptica al personal que no cuente con estudios mínimos de nivel medio superior ya que el Personal aspirante deberá leer continuamente los Procedimientos Normalizados de operación referentes a su departamento, se evaluara el conocimiento de cada procedimiento necesario para el desempeño de sus labores, archivando la evidencia documentada de su capacitación como lo establece la NOM-059
- El personal propuesto para trabajar en áreas asépticas, debe someterse a exámenes clínicos entre los que se deben incluir:
- La persona responsable dentro de la empresa de prestar el servicio médico deberá realizar un estudio de gabinete que deba incluir una inspección visual en donde reporte la detección de enfermedades tales:

-Enfermedades en vías respiratorias

-Enfermedades en pies, cuero cabelludo, manos piel en general

-Malos hábitos de higiene o cualquier otra enfermedad de indole infecciosa

- Se deben realizar estudios clínicos para completar el diagnóstico del personal propuesto para ingresar a un área aséptica con el fin de evitar ingresar cualquier tipo de contaminación al área y observar el estado salud del personal intentando identificar alguna enfermedad que pudiera complicarse con las actividades realizadas en áreas asépticas. Estos análisis deben incluir:

-Biometría hemática

-Exudado faríngeo

-Química sanguínea

-Examen general de orina

-Coproparasitoscopia

-Pruebas inmunológicas

-Perfil hormonal



- En caso de que en estos exámenes médicos no se obtengan resultados satisfactorios deberá darse un tratamiento, y dar seguimiento para comprobar el resultado del tratamiento y durante este tiempo no es posible permitir su ingreso a las áreas asépticas.
- Una vez que se hayan comprobado un buen estado de salud del personal se debe verificar que la persona cuente con conocimientos requeridos para laborar en este tipo de áreas, por lo que su supervisor debe capacitarlo y evaluarlo previamente acerca de:

-Conceptos básicos de Microbiología

-Técnicas de vestido

-Técnicas asépticas

-Reglas de higiene

-Filtración

-Esterilización

-Limpieza y sanitización

- Una vez que el Jefe de área verifique que el personal cuenta con estos conocimientos además de un buen estado de salud deberá solicitar su evaluación al Departamento de Validación de procesos y al área de Microbiología
- La calificación del personal será evaluada a través de un examen práctico en presencia del personal de Microbiología y de Validación de Procesos, incluirá técnica de vestido, desvestido y acondicionamiento del uniforme así cómo una serie de cuestionamientos que permitan verificar que conoce el comportamiento adecuado dentro de las áreas asépticas.
- Se realiza la evaluación con carbón que permite verificar si el personal se viste adecuadamente mediante una señal física sobre el uniforme verificado por su parte externa.
- Se debe realizar un monitoreo microbiológico completo del uniforme establecido en el PNO del área de Microbiología. Para la calificación del personal no debe de existir crecimiento de ninguna bacteria, hongos filamentosos y levaduras.

CAPITULO V

ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS. PRUEBA DE LAL

Actualmente los principales reguladores de productos farmacéuticos (Farmacopeas), incluyen dentro de sus monografías la aplicación del método del lisado de amebocitos de Limulus (LAL), para la liberación de pirógenos en productos terminados parenterales. El análisis de pirógenos constituye uno de los principales ensayos para el control de la calidad en la fabricación de productos farmacéuticos inyectables, ya que la presencia de estas sustancias dentro del organismo provoca una serie de respuestas fisiológicas de carácter perjudicial; producen un aumento de la temperatura central del organismo que caracteriza el efecto pirogénico. Este aumento de temperatura sólo es un componente de la actividad de las endotoxinas. También provoca escalofríos, cefaleas, disneas y en ciertos casos un estado de choque con hipotensión que puede producir la muerte por insuficiencia circulatoria aguda. Al nivel celular, se observa agregación plaquetaria seguida de liberación de sustancias vasoactivas y agregación de los leucocitos con liberación de diferentes factores que actúan a nivel de los centros termorreguladores del hipotálamo, produciendo hipertermia. Hay también activación de diferentes sistemas enzimáticos como los del complemento, la calicreína y la coagulación (Factor XII).

Dada la importancia de ofrecer al paciente un producto de administración parenteral libre de estas macromoléculas es necesario la determinación de pirógenos como parte de la evaluación de la calidad de medicamentos inyectable, así mismo durante la elaboración de productos inyectables se deben tomar todas las medidas concebibles para evitar la contaminación pirogénica, así cómo disponer de un ensayo confiable de control durante el proceso.



Esencialmente los pirógenos son sustancias que administradas por vía parenteral son capaces de provocar una respuesta febril, shock y muerte. Existen una gran variedad de pirógenos entre los que se encuentran el ácido lipotecoico, el peptidoglicano, el factor F de *Staphylococcus aureus*, ciertas toxinas de *Pseudomonas aeruginosa*, virus, hongos y endotoxinas bacterianas, estas últimas a nivel farmacéutico de mayor importancia ya que puede estar presentes como parte de contaminación durante la fabricación de un medicamento inyectable.

Por más de 40 años el ensayo de pirógenos mediante la determinación de la respuesta febril en conejos, permaneció invariable y su efectividad fue escasamente cuestionada. En la actualidad para la aprobación y comercialización de gran parte de los productos farmacéuticos y biotecnológicos diseñados para ser administrados por vía parenteral, las principales instituciones reguladoras internacionales exigen el control de pirógenos por el método de Lisado de amebocitos de LAL. El método de LAL es un método in vitro que detecta con alta sensibilidad la presencia de endotoxinas bacterianas.

5.1 ESTRUCTURA DE LAS ENDOTOXINAS

La composición de las endotoxinas varía dependiendo de la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. Las técnicas de extracción y purificación se han realizado en base al aislamiento del género de *Salmonella* cuya estructura se ha considerado como modelo del estudio de estas macromoléculas, lo que permite la comparación de dicha estructura en otras bacterias.

Los lipopolisacáridos (LPS) están constituidos por:

- Una parte hidrófila de distintos polisacáridos que forman cadenas laterales O específicas y el polisacárido central (núcleo).
- Una parte hidrófoba o lípido A

LA REGIÓN DE CADENAS O ESPECÍFICAS

Son cadenas poliosídicas constituidas por la unión repetitiva de una gran variedad de azúcares. Algunos de ellos son comunes a la mayoría de los lipopolisacáridos (glucosa, galactosa, manosa, glucosalina) mientras que otros no existen más que en ciertos serotipos (galactosamina, abecuosa, tivelosa, paratosa, coritosa). Cada serotipo bacteriano sintetiza un solo tipo de LPS caracterizado por una composición química y una estructura especial de las cadenas y su antigenicidad. Existen entonces tantos LPS diferentes como serotipos bacterianos.

LA REGIÓN DEL NÚCLEO

En las bacterias del género *Salmonella*, la región del núcleo esta formada por un hetero-oligosacárido corto constituido por cinco componentes: el KDO (2 ceto-3-deoxioctanato), el ácido D-glucónico, la N-acetilglucosamina, la D-glucosa, la D-galactosa, la L-glicero D manohexosa. La estructura del núcleo sólo esta un poco modificada de una especie a otra y no hay más que raras variaciones de la composición del núcleo en una misma especie bacteriana.

EL LÍPIDO A

Es la estructura básica más constante de los LPS. Su estructura debe describirse como el lípido A es responsable de la actividad endotóxica. Se trata de un fosfolípidico de constitución original con propiedades anfífilas, se forma de un disacárido central fosforilado que constituye el núcleo hidrófilo, sustituido por cadenas de ácidos grasos, que forman el polo lipófilo, el modelo más estudiado del lípido A es el de *Salmonella minnesota*.



Una parte hidrófila: Disacárido de D –glucosamina ligado y sustituidos de manera específica (enlace β 1'-6 sustituidos en 1' y 4 por dos grupos monoéster fosfórico), siempre presente y una región variable que corresponde a la sustitución no estequiométrica de grupos forforilados (β -amino-4-desoxi-L-arabinopiranososa GLN y una etanolamina fosforilada GLN).

Una parte hidrófoba: Formada de ácido β -3hidroximirístico (ácido β -3-OH-mirístico). El ácido graso en 3' se sustituye en 3 β -OH por otro ácido β -OH-mirístico.

El ácido graso en 3 no es 3-O-acilado y los otros dos ácidos son sustituidos sobre el β -OH en 3 por los ácidos grasos no hidroxilados y saturados en C12, C16 respectivamente por 2' y 2. La unión por el núcleo polisacárido, es decir por el KDO, se realiza al nivel del grupo hidroxilo primario en posición 6 de GLN.

Los ácidos grasos 3 β hidroxilados como el ácido 3 β -OH mirístico no se encuentran en los otros lípidos que forman la pared de las bacterias gramnegativas y parecen específicos de los LPS. El lípido A no existe en estado libre, se obtiene por la ruptura de su ligadura con el KDO o por síntesis química.

5.2 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La composición mínima requerida para conservar la actividad endotóxica no se conoce en su totalidad, pero se han realizado grandes progresos en el estudio de la actividad biológica de los diferentes derivados de síntesis del lípido A. Las cadenas O específicas son responsables de la antigenicidad, mientras que el lípido A es responsable de las propiedades endotóxicas. Las cadenas O específicas se comportan como haptenos y sólo son inmunógenas después del acoplamiento con otra molécula, núcleo y lípido A en el LPS o proteína.

5.3 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE LAL

El Limulus polyfemus es un artrópodo marino de la clase merostomata. Su homólogo asiático es Tachypleus tridendatus. Los amebocitos son las únicas células circulantes en la hemolinfa de este artrópodo marino en contacto con endotoxinas bacterianas. Los Limulus mueren por coagulación intravascular. Este fenómeno de coagulación se puede resumir en dos pasos:

1. La presencia de cationes divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+}), una proenzima, la procoagulasa, contenida en el LAL se activa por las endotoxinas de las bacterias gramnegativas. La cantidad de enzima activada es proporcional al número de moléculas de endotoxinas presentes.
2. Esta enzima activa, la coagulasa, es una serin proteasa que divide a una proteína coagulogena, en dos fragmentos, un fragmento de gran masa molecular rico en puentes disulfuro, la coagulina, que se agrega y forma un gel y un pequeño péptido llamado péptido C. El gel formado es estable, pero frágil sobre todo a las vibraciones que lo fracturan irreversiblemente.

La reacción completa incluye una serie de reacciones enzimáticas en donde la endotoxina en presencia de cationes divalentes actúa a nivel de la activación del primer factor. La procoagulasa es una glicoproteína que contiene un aglucosamina de peso molecular de 150000. La proteína coagulogena es un polipéptido lineal con 9 puentes disulfuro de un PM comprendido entre 23000 y 270000, y comprende alrededor de 220 aminoácidos. Después de la acción de la coagulasa se forman dos productos, la coagulina y el péptido C. La coagulina es una proteína insoluble en agua con un peso molecular de 180000 y 170 000. El péptido C es soluble en agua y sólo tiene 28 aminoácidos.

5.4 MÉTODOS DE LAL



Existen 3 variaciones básicas del ensayo de LAL en el mercado; método de gelificación o gelclot, turbidimétricos y cromogénicos. Cada fabricante del reactivo, describe su propia metodología pero el fundamento es el mismo en todos los casos.

5.4.1 MÉTODO DE GELIFICACIÓN

Es el ensayo clásico y el más elemental entre los métodos de LAL ya que es el ensayo menos susceptible a inhibición y requiere de un equipo sencillo y menos costoso. La presencia de endotoxinas es determinada por la formación de un gel o coagulo insoluble. Se puede desarrollar en forma cuantitativa o semicuantitativa. Produce resultados binarios ya sea positivo o negativo. Un tubo es positivo cuando el gel permanece intacto después de que se invierte cuidadosamente en un ángulo de 180°, cualquier otra condición es interpretada cómo negativa. El alcance del método esta limitado únicamente por la sensibilidad del lisado, existen reactivos de LAL con diferentes sensibilidades 0.03, 0.06, 0.12 UE/ml (Unidades de endotoxinas por mililitro). Con este método no es posible cuantificar endotoxinas por debajo de la sensibilidad del reactivo. La sensibilidad del reactivo es el parámetro más importante por lo que el laboratorio de Microbiología debe contar con un Procedimiento Normalizado de operación que verifique la sensibilidad de cada lote de reactivo de LAL que se adquiera.

5.4.2 MÉTODOS TURBIDIMÉTRICOS

Estos métodos se fundamentan por el aumento de turbidez en la mezcla de reacción provocado por el incremento de la concentración de coagulina insoluble, la cual se monitorea espectrofotométricamente. La proporción del aumento de turbidez esta relacionada con la concentración de endotoxinas de la muestra. Los métodos turbidimétricos son los más sensibles, capaces de detectar hasta 0.001 UE/ml. Existen dos variaciones de este método:

Turbidimétrico de punto final: El principal inconveniente es que se requiere de un tiempo de incubación y lectura controlada muy cuidadosa, la reacción no se detiene y por tanto la turbidez continúa complicando el dictamen.

Turbidimétrico cinético: Posee el más amplio rango de detección entre los métodos conocidos (0.001-100UE/ml). La principal desventaja es que requiere de un equipo costoso y de un personal muy calificado para el manejo de equipos y procesamiento de datos.

5.4.3 MÉTODOS CROMOGÉNICOS

Se fundamenta en el empleo de un sustrato cromogénico sintético incoloro. El sustrato está compuesto por un pequeño péptido unido por la arginina C-terminal a una molécula del cromóforo α -nitroanilina (pNA). Una vez activada la cascada de LAL, la enzima coaguladora provoca la liberación de un fragmento de pNA de color amarillo, el desarrollo de dicha coloración es proporcional a la concentración de endotoxinas en la muestra.

Estos métodos han sido empleados especialmente para la cuantificación de endotoxinas en muestras de plasma, sangre y otros fluidos biológicos. El equipamiento que requiere es costoso además de que el sustrato cromogénico es un reactivo muy caro e inestable. Cuenta con dos versiones un punto final y una cinética.

5.5 USO DE LA PRUEBA DE LAL EN LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS INYECTABLES.



Dada la actividad de las endotoxinas en el sistema circulatorio del ser humano descrito anteriormente una de las pruebas principales que permiten verificar la seguridad de un medicamento cuya vía de administración es parenteral es la prueba de LAL, esta se realiza a material de envase primario (ampolletas o jeringas), al agua de fabricación, y al Producto Terminado. También se emplea para validar al equipo de envasado y verificar que se encuentre libre de pirógenos aplicando los PNO adecuados.

5.5.1 AGUA DE FABRICACIÓN Y MATERIAL DE ENVASE PRIMARIO.

Se analiza el agua con la que se fabricara el medicamento y el área de inyectables debe esperar el dictamen de la Prueba de LAL antes de iniciar la fabricación, la muestra se debe tomar de la Línea de Osmosis Inversa de donde fue capturada la muestra y tomar una muestra del Tanque o recipiente donde serán mezcladas las materias primas para la fabricación, el recipiente de muestreo debe ser un frasco apirogénico, y se debe sanitizar la línea y drenar para obtener una muestra representativa y eliminar los microorganismos almacenados en las mangueras o tubos de almacenamiento, en caso de Tanque de acero inoxidable drenar el punto de salida previo al muestreo, se deben capturar más de 100 ml que permitan realizar Cuenta Total microbiana y verificar que se encuentren dentro de los límites permisibles según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente que actualmente es de 10 UFC/100 ml.

- Una vez que el reactivo de LAL y la muestra se encuentra a temperatura ambiente, se distribuye en 4 tubos de vidrio estériles y apirogénicos. Se coloca 0.1 ml del reactivo en cada uno de los tubos de vidrio agregándolo despacio por las paredes, posteriormente se adiciona 0.1 ml de la muestra.

- Se ponen dos controles uno positivo el cuál contendrá 0.1 ml reactivo de LAL, y 0.1 ml de endotoxina que deberá encontrarse a una concentración igual a la sensibilidad del reactivo de LAL y de esta forma verificar que el reactivo funciona correctamente. El control negativo contendrá 0.1 ml de reactivo LAL y 0.1 ml de agua apirogénica. Se incuba durante un tiempo de 60 minutos a 37°C sin ningún tipo de vibración o movimiento.

3. Concluido el tiempo de incubación se extrae la prueba de la incubadora y con todo cuidado se gira 180° el tubo.

Un resultado positivo se evidencia por la formación de un gel firme que se adhiere al fondo del tubo

Un resultado negativo se observa por un fluido acuoso, liquido que se desplaza con facilidad por el tubo.

El material de envase primario se enjuaga con agua o solución salina libre de pirógenos, aproximadamente 20 piezas y toda el agua de enjuague se mezcla en un frasco apirogénico del cuál se toma 0.1 ml de la muestra y se procede a analizar cómo se describió anteriormente

5.5.2 PRODUCTO TERMINADO

En el caso de Producto Terminado, cada medicamento inyectable debe ser validado para conocer la concentración máxima permisible de endotoxinas (CMPE) en el producto. Se calcula CMPE por la dosis máxima terapéutica (M) en mg o ml/kg de peso del paciente y la sensibilidad humana a las endotoxinas bacterianas (K). El valor de K es igual a 5 UE/kg/hora por la vía intravenosa (IV) o 10 UE/kg/hora por vía intrarraquidea (IR).

La concentración máxima permisible de endotoxinas se representa por la relación M/K expresada en UE/ml o UE/ml.

La dilución máxima válida (DMV) se obtiene por la relación



$$DMV = CMPE / \lambda$$

λ Es la sensibilidad del reactivo dependiendo del fabricante.

Se deben establecer controles en diversas etapas del envasado y poner mayor intención en las etapas críticas del proceso, de esta manera se debe muestrear el medicamento y enviar estas muestras a análisis para Prueba de LAL.

CAPITULO VI PRUEBA DE ESTERILIDAD

El ensayo de esterilidad aplicado al producto Terminado deberá considerarse sólo como la última de una serie de medidas de control mediante las que se garantiza la esterilidad.

Las muestras que se tomen para la esterilidad deberán ser representativas de un conjunto del lote, pero entre ellas deberán incluirse especialmente las tomadas de las partes del lote que se consideren con mayor riesgo de contaminación, durante cada proceso particular. Considerando la definición de esterilidad, como la ausencia total de organismos vivos, esta es una condición fundamental para productos que son ingresados al organismo vía parenteral, aquellos medicamentos inyectables o bien los materiales de empaque primarios. La prueba de esterilidad se fundamenta en la detección de formas viables de microorganismos en medios de cultivo adecuados para crecimiento de bacterias, hongos y levaduras que se pueden encontrar como contaminantes en sustancias, preparaciones y materia prima estériles. Puede realizarse de dos maneras por filtración de un volumen específico de muestra empleando una membrana de 0.2 micras, o bien directa en caso de material de envase primario como ampollitas, jeringas o material quirúrgico. La prueba de esterilidad es verdaderamente crítica por lo que se deben considerar ciertos parámetros a evaluar:

- En la promoción a medios de cultivo, los medios de cultivo normalmente empleados para realizar la prueba de esterilidad especificados en la Farmacopea son los medios de Caldo Soya Trypticaseina y Caldo Tioglicolato para hongos y bacterias respectivamente a los cuales se les debe realizar una prueba de promoción de crecimiento por cada lote de preparación.
- Se debe realizar una prueba de inhibición, esto es la filtración de medios de cultivo posterior a la filtración de la muestra con el fin de detectar algún tipo de inhibición del crecimiento de los microorganismos debido al producto, en lo cual se debe establecer que aditivo se adicionara para neutralizar dicho efecto, aumentar el medio de cultivo, o bien el número de enjuagues según convenga.
- La cantidad de muestras a analizar deben ser las establecidas en la Farmacopea vigente.
- La prueba se debe realizar dentro de un área aséptica con todas las condiciones descritas en el Capítulo 1, se debe realizar en una Campana de Flujo laminar, la cual debe estar calificada en cuanto a la integridad de filtros y velocidad de flujo.
- La vestimenta, comportamiento y conocimientos del personal deben ser las requeridas para ingresar a áreas asépticas, además de capacitación con respecto a la prueba de esterilidad.

CAPITULO VII SISTEMA DE DOCUMENTACIÓN

7.1 DEFINICIÓN

La documentación es una parte fundamental del Aseguramiento de calidad dentro de la industria farmacéutica. Un documento es aquella información que es útil para el empleo de la demostración de calidad de un medicamento. Los objetivos principales de un sistema de documentación son:

- Definir las especificaciones y procedimientos para todos los materiales y métodos de producción y control.
- Garantizar que todo el personal relacionado con la producción sepa que hacer y cuándo lo tiene que realizar.



-Garantizar que las personas autorizadas tengan toda la información necesaria para decidir si se libera o no un lote de medicamento para la venta

-Garantizar la existencia de evidencias documentadas, trazabilidad y registros que permiten a una auditoria realizar una investigación

-Garantizar la disponibilidad de datos necesarios para la validación, revisión y análisis estadístico.

La documentación es un instrumento esencial que evita errores y ayuda a la investigación de los procesos, todos los documentos deberán estar escritos en forma clara y empleando un vocabulario sencillo, indicando el tipo, naturaleza, propósito o uso del documento, las instrucciones deben escribirse en secuencia lógica, continua y numerada.

Los documentos maestros deben ser preparados, firmados y fechados por personas competentes y responsables, después son verificados, firmados y fechados por otra persona que sea independiente a la primera para evitar errores. Cualquier modificación o cancelación de un documento maestro será aprobado por una persona reconocida dentro de la organización, regularmente la máxima autoridad reconocida, el responsable sanitario.

Las buenas prácticas de documentación son un conjunto de actividades relacionadas, que como parte integral de las buenas prácticas de fabricación, contribuyen a mantener la calidad de los productos farmacéuticos, mediante el manejo controlado de la información y el correcto funcionamiento del sistema de documentación.

La estructura de un sistema de documentación involucra:

1. Legales
2. De compromiso
3. Directivos
4. Registros de datos
5. Trazabilidad

7.2 CLASIFICACIÓN DE DOCUMENTOS

Documentos legales - Registro de productos
 - Licencias de producción
 - Certificados

Documentos de compromiso - Manual de calidad
 - Programas de calidad
 - Planes maestro

Documentos directivos - Expedientes maestros de lote
 - **Procedimientos**
 - Especificaciones
 - Protocolos

Documentos de registro de datos - Expediente de lote
 - Registros
 - Resultados
 - Informes

Documentos de trazabilidad - Números de codificación

7.2 PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

7.2.1 DEFINICIÓN



Los procedimientos normalizados de operación son documentos que describen de forma detallada y por escrito las operaciones, precauciones y medidas, que deben ser aplicadas directa o indirectamente en alguna actividad o proceso.

La importancia de un procedimiento normalizado de operación radica en que contienen todas las instrucciones paso a paso que se consultan diariamente para realizar su trabajo de forma confiable y consistente, además de ser una real recopilación de la experiencia de los individuos que desempeñan el trabajo y la capacitación asociada con la actividad.

7.2.2 CARACTERISTICAS

- Un procedimiento es emitido revisado y autorizado por expertos en la actividad que se describe
- Debe ser acorde con el sistema de calidad
- Esta vigente
- Es de fácil acceso
- Es parte de un listado maestro
- Se distribuye y se controla adecuadamente
- Es escrito en el idioma local y es legible
- Cumple con un formato establecido
- Se debe reproducir a través de un método que no de lugar a errores
- Una vez aprobado el procedimiento debe difundirse y capacitar al personal que lo utilizara
- Es revisado, actualizado y perfeccionado e incluye un control de cambios
- Se conserva el tiempo estipulado.

7.2.3 CONTENIDO

- Describe el propósito y objetivo del proceso
- Enfatiza los pasos críticos
- Define responsabilidades
- Da la secuencia de las actividades a realizar
- Proporciona una guía para la resolución de los problemas
- Refiere a otros procedimientos

7.2.4 INDICE GENERAL

1. TITULO: Debe ser corto pero dar una idea de la actividad a describir.
2. OBJETIVO: Deberá contener la descripción del procedimiento es decir el propósito, y el término global que parte de la actividad durante el proceso permitirá realizar.
3. ALCANCE: Menciona a qué aplica, quien lo aplica, donde y cuando se aplica.
4. PERSONAL INVOLUCRADO: Se incluirá una lista de los involucrados en cada una de las actividades realizadas en el procedimiento. Desde el operario hasta el que verifica que se hayan realizado correctamente cada uno de los pasos descritos en el procedimiento.
5. RESPONSABILIDADES: Se deberá indicar quien supervisa, controla y lleva a cabo.
6. MATERIAL A UTILIZAR: Se incluirá una lista de los materiales y/o utensilios que se necesitan en cada una de las actividades descritas en el procedimiento.



7. **PROCEDIMIENTO:** Describirá la forma de realizar todas y cada una de las actividades que se realicen en el procedimiento, enumerando cada uno de los pasos a seguir de forma sencilla y explícita.
8. **CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** Se describirán las especificaciones de aceptación o rechazo de acuerdo al procedimiento y se dará el visto bueno de las actividades realizadas
9. **DOCUMENTACIÓN:** Deberá de especificar la forma en que se documentan las actividades realizadas, ya sea en bitácoras, tarjetas o etiquetas. Incluyendo datos tales cómo: fecha, hora, producto, Número de lote, etc.
10. **DISTRIBUCIÓN:** Se incluirá una lista, donde se mencione a cada uno de los involucrados en el Procedimiento y los cuales deberán contar con una copia autorizada del mismo.
11. **REFERENCIA:** Deberá anotarse los documentos, procedimientos o bibliografía extra consultada para la realización del Procedimiento.
12. **DIAGRAMA DE FLUJO:** Se presentara en forma sintetizada por medio de un diagrama cada una de las actividades descritas en el procedimiento.
13. **ANEXO:** Es opcional. También debe llevar encabezados. Se refiere a diagramas, tablas, formatos o cualquier documento que ayude al entendimiento del procedimiento.



PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN



LISTA DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

1. Evaluación de sanitizantes.
2. Esterilización por calor húmedo.
3. Esterilización y despirogenización por calor seco.
4. Verificación de la efectividad de indicadores biológicos.
5. Vestido y desvestido con el uniforme estéril.
6. Evaluación Microbiológica del vestido del personal.
7. Monitoreo ambiental del área aséptica de inyectables.
8. Prueba de esterilidad.
9. Determinación de endotoxinas bacterianas a Producto Terminado por el método de Lisado de amebocitos de Limulus.
10. Prueba de LAL a material de empaque.



Departamento:	PROCEDIMIENTO GENERAL NORMALIZADO	Código:
Título:	EVALUACIÓN DE SANITIZANTES	Página 34 de 12
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

ÍNDICE	PÁG.
I OBJETIVO	2
II ALCANCE	2
III PERSONAL INVOLUCRADO	2
IV RESPONSABILIDADES	2
V MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS	3
VI PROCEDIMIENTO	4
VII INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y CÁLCULOS	10
VIII CRITERIO DE ACEPTACIÓN	10
IX FRECUENCIA	10
X DOCUMENTACIÓN	11
XI LISTA DE DISTRIBUCIÓN	11
XII BIBLIOGRAFÍA	12
XIII DIAGRAMA DE FLUJO	13
XIV ANEXO I "FORMATO DE REPORTE DE EVALUACIÓN DE SANITIZANTE"	13



I OBJETIVO

1. Contar con un procedimiento que describa la forma de determinar que los sanitizantes a utilizar cumplan con una adecuada actividad antimicrobiana.

II ALCANCE

1. Aplica a cada lote de sanitizantes empleados en las áreas de Producción y Microbiología, de acuerdo al programa de rotación de sanitizantes, así como aquellos sanitizantes de posible uso en las áreas de fabricación.

III PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de calidad.

IV RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico del área de Microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad del Jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleva a cabo de forma correcta.
4. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad tener conocimiento de este procedimiento.

V MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

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 Craft temperatura 35 ± 2 °C.
2. Incubadora Craft temperatura 25 ± 2 °C.
3. Espectrofotómetro.
4. Vortex.

REACTIVOS

1. 10 tubos de ensaye de 20 x 150 mm con 9 ml de solución buffer de fosfatos pH 7.2.
2. Agar letheen.
3. Agar de soya tripticaseina (**AST**).
4. Agar dextrosa saboraud (**ADS**).

VI PROCEDIMIENTO

1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

- 1.1. Antes de realizar la prueba de actividad antimicrobiana, resiembre los siguientes microorganismos por estría cerrada en cajas petri con medio de agar soya tripticas y agar dextrosa saboraud según aplique.

- | | |
|---------------------------|-------------|
| A. Staphylococcus aureus | ATCC 6538p. |
| B. Pseudomonas aeruginosa | ATCC 25619 |
| C. Escherichia coli | ATCC 10536 |
| D. Bacillus subtilis | ATCC 6633 |
| E. Salmonella typhimorium | ATCC 6539 |



F. <i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
G. <i>Candida albicans</i>	ATCC 6539
H. Microbiota de la planta	(3 bacterias)
I. Microbiota de la planta	(3 hongos)



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

Incube **ADP** a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 días.

1.3. Una vez concluidos el tiempo 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, transfiera el sobrenadante a un frasco estéril.



1.3.1. Identifique cada frasco con los siguientes datos:

- ✓ Nombre del microorganismo.
- ✓ ATCC.
- ✓ Fecha.
- ✓ Analista.



- 1.4. Determine el número de Unidades Formadoras de Colonias UFC / ml y precise el porcentaje de transmitancia de una suspensión que contenga de 75 a 125 x 10⁸ UFC/ ml y considere este valor de transmitancia para análisis futuros.



2. DETERMINACIÓN DE LA CUENTA VIABLE INICIAL.

- 2.1 A un tubo de ensaye que contenga 9 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH=7.2 transfiera 1 ml de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectúe diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan entre 25 y 250 colonias.



- 2.2. Coloque 1 ml de cada una de las diluciones en cajas petri, agregue de 15 a 18 ml de agar Letheen, homogenice y deje solidificar, invierta las placas e incube 48 horas a 35 °C ± 2 °C.



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



3. PREPARACIÓN DE LA SERIE SANITIZANTE.

- 3.1. Prepare las diluciones de cada sanitizante de acuerdo a la concentración recomendada por el fabricante y transfiera 9 ml de esta solución en tubos con capacidad de 15 ml (utilice para su preparación agua desionizada).



- 3.2. Inocule cada tubo con 1 ml del microorganismo previamente ajustado a la transmitancia que contiene de 75 a 125×10^8 UFC/ml.



Agite perfectamente con ayuda de un vortex.



- 3.3. A partir del contacto con el sanitizante tome el tiempo con un cronómetro y deje actuar durante 5 minutos, este paso debe realizarlo con la mayor exactitud posible.



- 3.4. Transcurridos los 5 minutos tome 1 ml de esta suspensión y colóquelo en el tubo que contiene 9 ml de caldo neutralizante previamente preparado.



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



- 3.6. Agite perfectamente con el vortex entre dilución y dilución.
La décima dilución corresponde al tubo que contiene la solución neutralizante.



- 3.7. Siembre 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.

- 3.8. Agregue 20 ml de agar Lethen a cada una de las placas y deje solidificar.



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

3.10. Compare con respecto al control.

4. PREPARACIÓN DE TESTIGOS NEGATIVOS

4.1. Vierta en 4 cajas petri aproximadamente 20 ml de agar Lethen, empleando para el análisis e incube 2 de ellas a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, y el resto de las cajas a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. Transfiera el contenido de 4 tubos del buffer empleado en la prueba a cajas petri, y agregue 20 ml aproximadamente de agar Lethen, e incube 2 de ellas a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para mesófilos y 2 cajas a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para hongos.

VII INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y CÁLCULOS

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

a) Calcule el porcentaje de reducción.

$$\% \text{ de reducción} = 100 - S \times [100 / \text{C.V.}]$$

Donde:

S= Células sobrevivientes UFC/ml

C.V.= Cuenta viable inicial.

2. **Efecto del sanitizante.**

a) Del número obtenido de UFC de la C.V. y de las sobrevivientes, determine el logaritmo y aplique siguiente fórmula:

$$\text{EFECTO SANITIZANTE} = \log \text{C.V.} - \log S$$



Donde:

C.V. = Cuenta viable inicial.

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

3. Los testigos no deben presentar crecimiento alguno.

VIII CRITERIO DE ACEPTACIÓN

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

IX FRECUENCIA

1. Cada vez que ingrese un nuevo lote del sanitizante que se encuentra en uso.
2. Cuando se requiera la evaluación de nuevos sanitizantes para posible uso en las áreas de fabricación.

X DOCUMENTACIÓN

1. Registrar en formato correspondiente.

XI LISTA DE DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Microbiología.

XII BIBLIOGRAFÍA

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



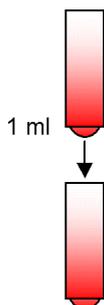
XIII DIAGRAMA DE FLUJO

RESIEMBRE LOS MICROORGANISMOS A EMPLEAR MEDIANTE ESTRÍA CERRADA

REALICE UNA SUSPENSIÓN QUE CONTENGA DE 75 A 125 X 10⁵ UFC/ml, DETERMINANDO EL PORCENTAJE DE TRANSMITANCIA

DETERMINE LA CUENTA VIABLE INICIAL MEDIANTE DILUCIONES DECIMALES. DEBE CONTENER DE 25 A 250 COLONIAS.

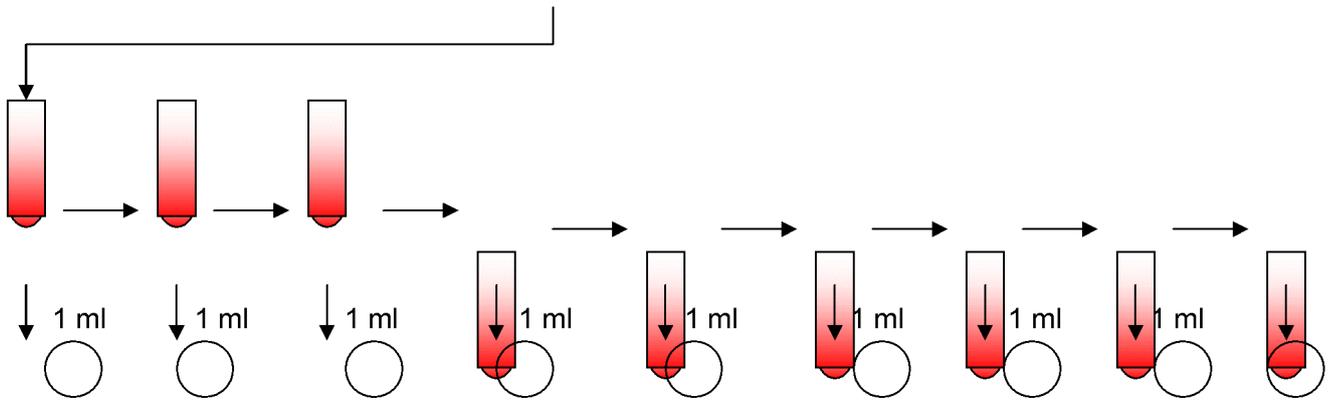
PREPARE LA SOLUCIÓN DEL SANITIZANTE A PRUEBA A LA CONCENTRACIÓN SUGERIDA POR EL PROVEEDOR



9 ml de sanitizante + 1 ml de microorganismo Durante 5 min.



9 ml del medio
neutralizante



Departamento: Control de Calidad	PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA	Código:
Título: ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO		Página 45 de 12
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

ÍNDICE	PÁG.
I. INTRODUCCIÓN	2
II. OBJETIVO	2
III. ALCANCE	2
IV. PERSONAL INVOLUCRADO	2
V. RESPONSABILIDADES	3
VI. MATERIA, EQUIPO Y REACTIVOS	3
VII. GENERALIDADES	4
VIII. PROCEDIMIENTO	
IX. CRITERIO DE ACEPTACIÓN	
X. LISTA DE DISTRIBUCIÓN	
XI. REFERENCIA	



I. OBJETIVO

Contar con un procedimiento que describa la forma adecuada de aplicar el procedimiento de esterilización aplicando cargas previamente aprobadas mediante la validación del proceso, con el fin de garantizar la confiabilidad de los análisis microbiológicos.

III. ALCANCE

1. Aplica a todo el material, medios de cultivo y soluciones que requieran condiciones de esterilidad.

IV. PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de calidad.

V. RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico del área de Microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad del Jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleva a cabo de forma correcta.
4. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, tener conocimiento de este procedimiento.

VII. PROCEDIMIENTO

1. PREPARACION DE UNIFORMES, MATERIAL, MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.
A. Uniformes.



Prepare de acuerdo al procedimiento: "Acondicionamiento del uniforme para el área aséptica" POPCM-09.

Envuelva de manera individual con papel glassin e identifique con:

- Talla.
- Fecha de esterilización.
- Nombre de la persona que realiza el proceso.

Coloque una tira de cinta testigo en lugar visible.

B. Medios de cultivo y soluciones.

Prepare los medios de cultivo y soluciones de acuerdo a procedimiento "Preparación de medios de cultivo" PGNMCM-007/3.

La distribución de los volúmenes no debe ser mayor de 2/3 partes de la capacidad del recipiente (tubos, matraces, frascos, etc.), además de que la capacidad de estos debe ser semejante.

Rotule todo recipiente con medio de cultivo o solución deberá ser rotulado de la siguiente forma:

- Nombre del medio de cultivo o solución.
- Fecha de esterilización.
- Nombre de la persona que realiza el proceso.

Para su esterilización debe cubrirlo de tal forma que permita la penetración del vapor: los recipientes deben ir cubiertos con tapones de baquelita o torunda de algodón; verificar que los tapones estén a medio cerrar y proteger con papel glassin todo aquel recipiente con tapón de algodón.

A cada uno de los recipientes se les coloca una tira de cinta testigo en lugar visible.

C. Material.

- Gasas.
- Guantes.
- Pinzas.
- Frascos.
- Filtros.
- Rejillas para centrifugo de aire.
- Tijeras.

Todo el material debe rotularse con la siguiente información:

- Nombre del material
- Fecha de esterilización.
- Nombre de la persona que realiza el proceso.



Envuelva perfectamente el material en forma individual con material permeable resistente al calor cómo el papel glassin.

Si el material a esterilizar es un recipiente con tapón de cerrado hermético (frascos, matraces o tubos) coloque el tapón a medio cerrar para permitir la penetración del calor.

Coloque a todo el material una tira de cinta testigo.

2. ESTERILIZACION

Para llevar a cabo la esterilización aplique los patrones de carga establecidos:

Patrón de carga No 1

- **Tiempo de esterilización:** 30 minutos
- **Temperatura para comenzar a contar el tiempo e esterilización:** 121°C + 4°C
- **Presión:** 1.5 kg/cm²
- **Programa:** Paquete
- **Tiempo de secado:** 15 minutos

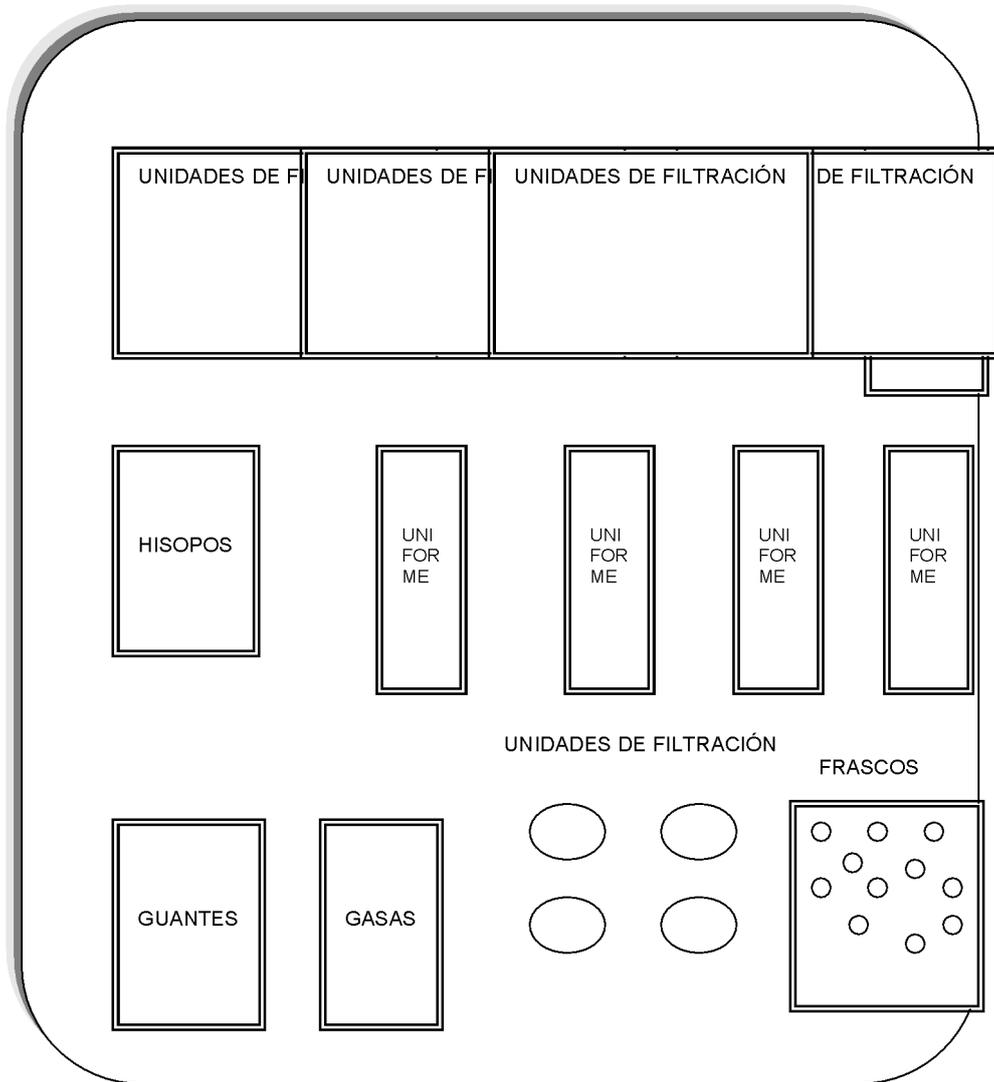
Detalles de la carga

- 4 paquetes conteniendo 3 unidades de filtración
- 2 paquetes de gasas
- 1 rejilla con 50 paquetes conteniendo cada uno 5 hisopos
- 4 paquetes conteniendo cada uno un uniforme completo
- 3 Matraces Erlenmeyer
- 1 paquete con guantes
- 5 paquetes conteniendo cada uno una unidad de filtración
- 1 rejilla conteniendo 11 frascos de vidrio con tapa de baquelita cubiertos de aluminio.

NOTA: Patrón de carga de acuerdo al protocolo VAVL00904



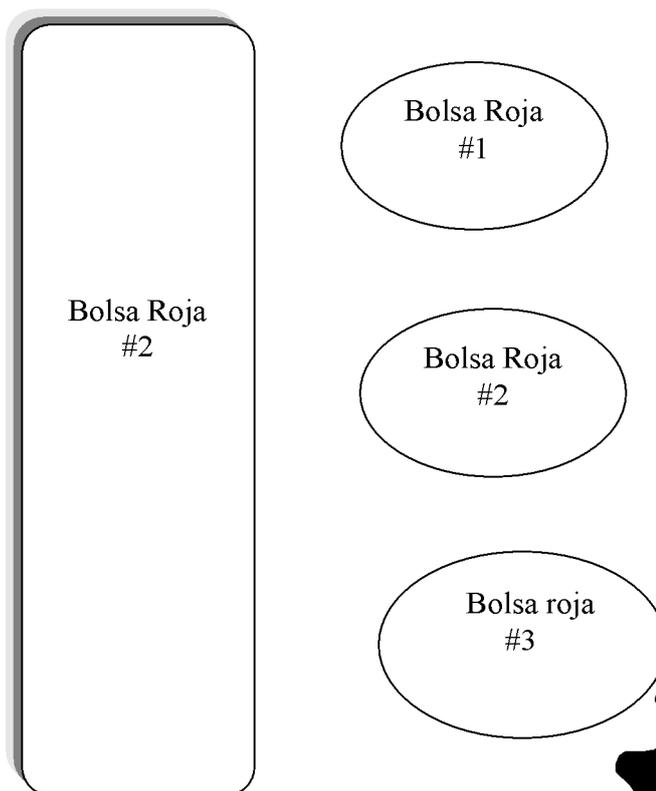
ESQUEMA DEL PATRÓN DE CARGA No. 1



Patrón de carga No 2

- **Tiempo de esterilización:** 60 minutos
- **Temperatura para comenzar a contar el tiempo e esterilización:** 121°C + 4°C
- **Programa:** Paquete
- **Tiempo de secado:** 15 minutos
- Detalles de la carga:
 - 2 bolsas rojas llenas a $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con cajas petri desechables con material contaminado.
 - 1 bolsa roja llena a la mitad de su capacidad con cajas petri que contenga material contaminado.
 - Nota: Las bolsas se colocan sobre una charola de acero inoxidable.

ESQUEMA DEL PATRÓN DE CARGA No. 2



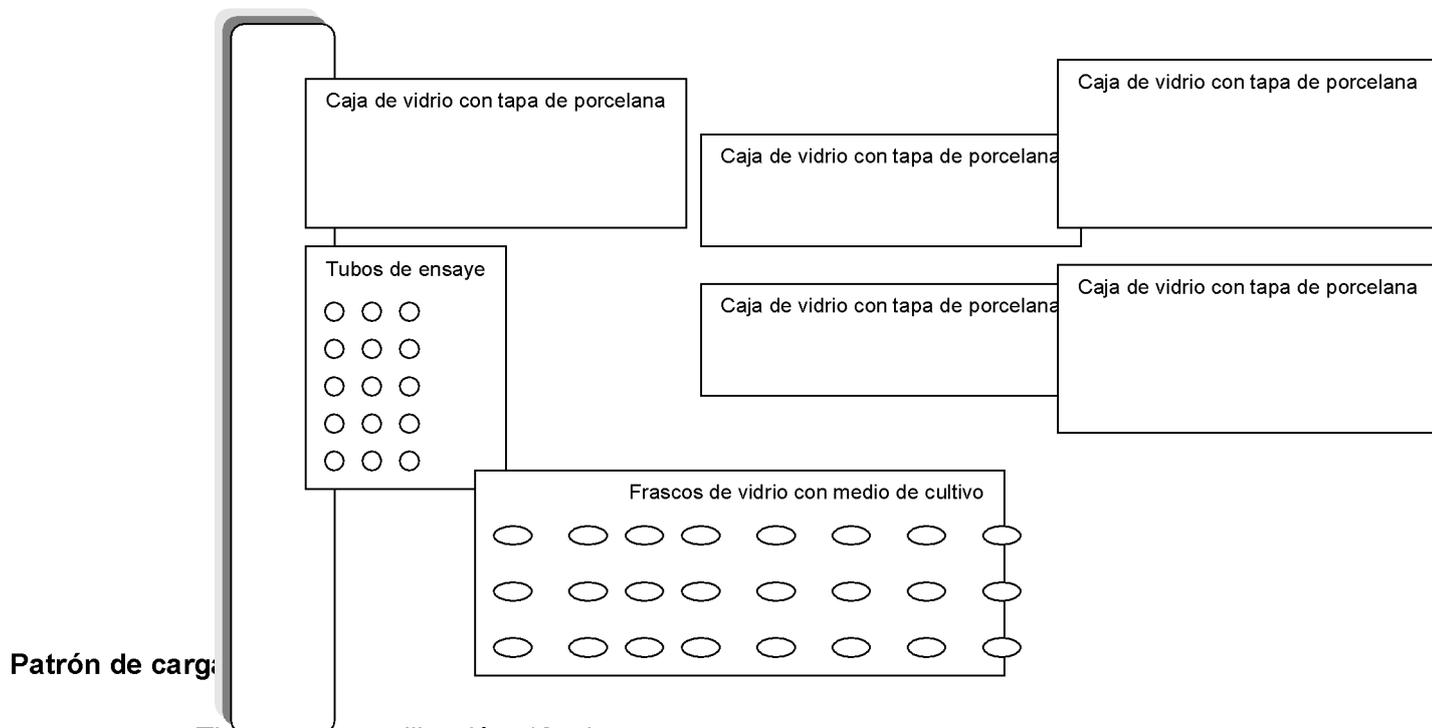
Patrón de carga No 3

- Tiempo de esterilización: 30 minutos.



- Temperatura para comenzar a contar el tiempo e esterilización: 121°C.
- Programa: Líquidos
- Detalles de la carga:
 - 1 rejilla con 12 cajas Petri de vidrio con tapa de porcelana conteniendo material contaminado y un vaso de precipitado con penicilindros.
 - 1 rejilla con 5 cajas de Petri de vidrio con tapa de porcelana conteniendo material contaminado.
 - 1 rejilla con 4 cajas de Petri de vidrio con tapa de porcelana conteniendo material contaminado.
 - 2 rejilla con 18 cajas de Petri de vidrio con tapa de porcelana conteniendo material contaminado.
 - 1 rejilla con 32 frascos de vidrio con tapa conteniendo 90 ml de medio de cultivo contaminado.
 - 1 rejilla con 50 tubos de ensaye con tapa conteniendo 30 ml de medios de cultivo contaminado.

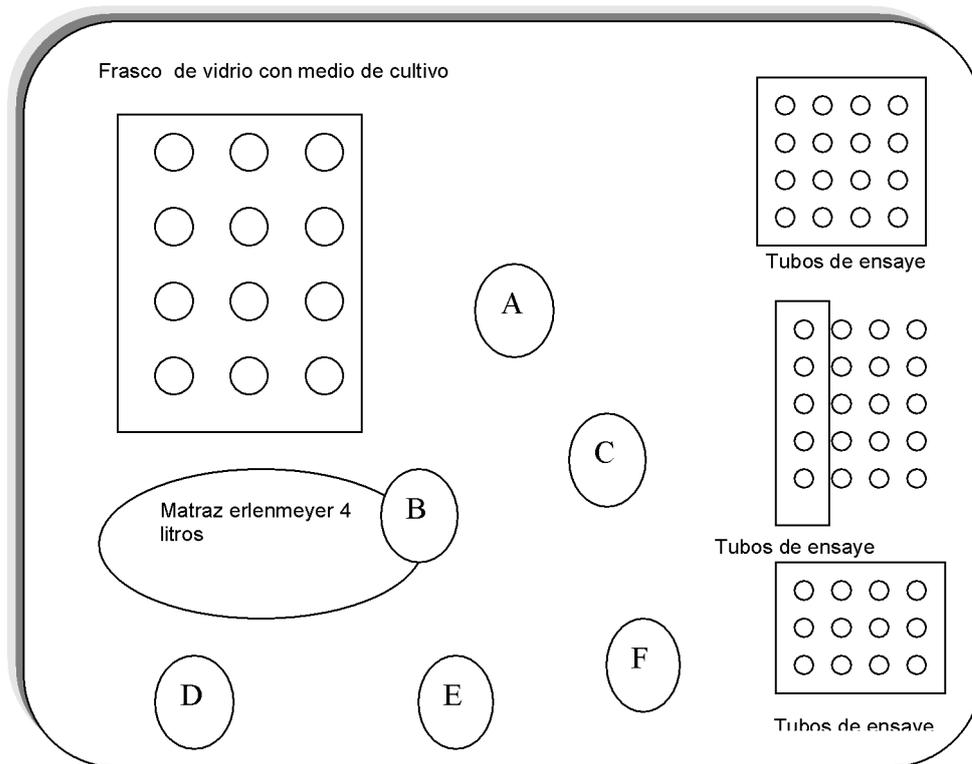
Esquema del patrón de carga No. 3



- Tiempo de esterilización: 40 minutos.
- Temperatura para comenzar a contar el tiempo e esterilización: 121°C.
- Programa: Líquidos
- Detalles de la carga:
 - 1 rejilla con 32 frascos de vidrio con tapa conteniendo 90 ml de medio de cultivo.
 - 1 rejilla con 10 tubos de ensaye con tapa conteniendo 30 ml de medio de cultivo.
 - 2 rejilla con 28 tubos de ensaye con tapa conteniendo 30 ml de medio de cultivo.
 - 1 matraz Erlenmeyer de 4 litros conteniendo 2.5 litros de medio de cultivo.
 - 3 matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo 800 ml de medio de cultivo.
 - 3 matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo 800 ml de medio de cultivo.

Esquema del patrón de carga No. 4





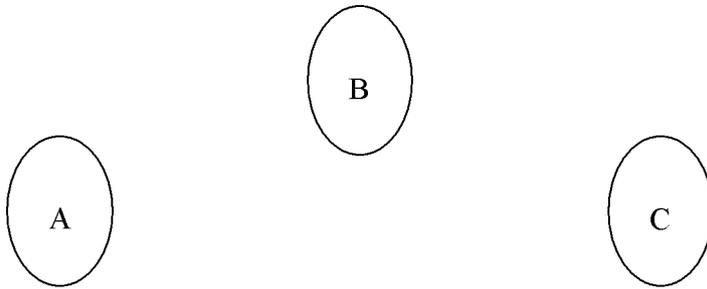
A-F Matraz Erlenmeyer conteniendo 800 ml de medio de cultivo

Patrón de carga No 5

- Tiempo de esterilización: 45 minutos.
- Temperatura para comenzar a contar el tiempo e esterilización: 121°C
- Programa: Paquete
- Tiempo de secado: 15 minutos
- Detalles de la carga:
 - 1 tanque de filtración contaminado.
 - 1 juego de accesorios para filtración contaminado.
 - 3 matraces Erlenmeyer de 4 litros conteniendo cada uno 800 ml de medio de cultivo.

Esquema del patrón de carga No. 5





A – C Matraz Erlenmeyer capacidad de 4 litros conteniendo de medio de cultivo

VIII. DOCUMENTACIÓN

8.1 Cada proceso de esterilización debe registrarse en la bitácora No 15 “Control de esterilización en el autoclave” la siguiente información:

- Fecha
- Descripción de la carga
 - Temperatura
 - Presión
 - Hora inicio
 - Hora termino
- Indicadores biológicos
- Prueba de esterilidad
 - Analista
- Observaciones

8.2 Registrar el empleo de cada bioindicador empleado para evaluar el proceso de esterilización en la bitácora No 42 “Bioindicadores”.

- Fecha
- Lote de proveedor
- Tipo de esterilización
 - Posición
 - Resultado
- Fecha final de incubación
- Observaciones
 - Analista
 - Verifico

IX. CRITERIO DE ACEPTACIÓN

El presente procedimiento cumple sí:

- 1.1 Se cumple con cada uno de los puntos descritos en el presente procedimiento.
- 1.2 Se respetan los patrones de carga establecidos conforme a la validación del proceso de esterilización.
- 1.3 Las condiciones de temperatura y presión se mantienen adecuadamente durante todo el ciclo de esterilización.



1.4 El tiempo del ciclo es completo y su temperatura se mantiene constante durante el proceso evidenciado en la gráfica obtenida.

1.5 Los indicadores biológicos empleados en el proceso de esterilización muestran resultados satisfactorios.

X. LISTA DE DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad
2. Jefatura de Control de Calidad
3. Microbiología

XI. REFERENCIA

1. Protocolo de Validación del Proceso de esterilización por calor húmedo en autoclave. Realizado en Importadora y Manufacturera Bruluart al autoclave Temsa modelo TEM204-36. Vigencia 14 al 18 de Junio 2004. Referencia VAVL00904.

II. DIAGRAMA DE FLUJO

Preparación de uniformes, material, medios de cultivo o soluciones a esterilizar.



Colocar el material conforme a los patrones de carga establecidos incluyendo el uso de indicadores biológicos.



Programar el autoclave conforme al PNO "Operación del autoclave" POPOM-001/S e iniciar el proceso de esterilización.



Incubar los bioindicadores y registrar en la bitácora No 42 el empleo de estos, así cómo el proceso de esterilización por carga en la bitácora No 15.



Departamento: Control de Calidad	PROCEDIMIENTO GENERAL NORMALIZADO	Código:
Título: ESTERILIZACIÓN Y DESPIROGENIZACIÓN POR CALOR SECO		Página 56 de 11
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

ÍNDICE	PÁG.
XIII. OBJETIVO	2
XIV. ALCANCE	2
XV. RESPONSABILIDADES	2
XVI. MATERIAL, EQUIPO Y MEDIOS	3
XVII. PROCEDIMIENTO	4
XVIII. DOCUMENTACIÓN	9
XIX. CRITERIO DE ACEPTACIÓN	10

I. OBJETIVO

- Garantizar la confiabilidad de los análisis microbiológicos mediante el tratamiento de material para esterilizarlo y despirogenizarlo por calor seco.

II. ALCANCE



Se aplicará a todo aquel material que requiera cumplir con la característica de apirogenicidad.

II. RESPONSABILIDAD

1. Es responsabilidad del personal auxiliar, Técnico y Químico de Microbiología, el aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología, y del Jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, tener conocimiento de éste procedimiento.

IV. MATERIAL, EQUIPO Y MEDIOS

Material de vidrio

Tubos de ensaye.

Matraces Erlenmeyer.

Matraces volumétricos

Frascos

Cajas Petri.

Material de acero inoxidable.

Pinzas.

Rompe ampollitas.

Jarras de 500 ml.

Espátulas/cucharones



Papel aluminio.

Horno.

Caldo de soya tripticaseína.

V. PROCEDIMIENTO

El proceso de despirogenización por calor seco solo se considera para material cuya resistencia térmica sea superior a los 150°C.

EQUIPO.

El horno en el cual se lleva a cabo el proceso de despirogenización es el siguiente:

Marca: Craft

- Modelo: HFA 1900 D
- No. de serie: 99007
- Temperatura Programada: 250 ± 10°C.
- Dimensiones interiores: 90 cm de frente X 72 cm de fondo X 133 cm de alto.

PREPARACION DEL MATERIAL

1. El área donde se prepara el material debe ser específica para este fin y limpia.
2. Acondicione el material de la siguiente manera:
3. En el caso de frascos, matraces o tubos, cubra la boca con papel aluminio.
4. Las pipetas se depositan en recipientes de acero inoxidable (pipeteros).
5. En caso de cajas de Petri, acondicionar éstas en paquetes de seis y envolver en papel aluminio.
6. Jarras, pinzas, rompeampolletas, espátulas y cucharones se acondicionan envolviendo individualmente en papel aluminio.
7. Deposite el material en charolas de acero inoxidable y colóquelas en el horno.



Nota: No usar fibras sintéticas o de algodón para acondicionar el material.

DISTRIBUCION DEL MATERIAL EN EL HORNO

Patrón de carga No.1:

- Temperatura programada a 260°C
- Esterilización: 60 minutos a partir de que se tenga la temperatura de 230°C
- Detalles de la carga:
 - ❖ 20 Frascos lecheros
 - ❖ 10 espátulas
 - ❖ 4 Frascos con penicilindros
 - ❖ 5 Jarras
 - ❖ 10 Frascos con buffer
 - ❖ 5 Viales
 - ❖ 10 Tubos buffer 21 x 10
 - ❖ 6 Paquetes con 6 cajas petri cada uno
 - ❖ 3 Muestreadores de líquidos

Se maneja un patrón de carga que será distribuido de la siguiente manera:

Nivel 1: 10 paquetes con 6 cajas Petri cada uno.

Nota: Coloque el material en este nivel de tal manera que se dejen espacios libres donde se localiza la resistencia (lado derecho).

Nivel 2: 8 rompeampolletas
10 espátulas/cucharones
4 frascos con penicilindros



2 matraces Erlenmeyer

Nivel 3: 30 frascos distribuidos en 2 charolas

3 jarras.

Nivel 4: 30 matraces aforados colocados en 2 charolas

Los indicadores biológicos se colocan 1 por nivel en el lugar indicado en la figura 2.

Cada indicador deberá ser identificado:

Nivel

Fecha

DESPIROGENIZACIÓN.

1. Encienda el equipo.
2. Programe la temperatura de operación ($250 \pm 10^{\circ}\text{C}$).
3. Dejar transcurrir 60 minutos, que es el tiempo requerido para alcanzar 250°C dentro de toda la cámara.
4. Permita la despirogenización del material durante 2 horas.
5. Verifique la temperatura que existe en la cámara interior a los 30, 60 y 120 minutos durante el proceso en la pantalla digital del panel de control.
6. Registre la temperatura en el formato de registro de temperaturas a los 30, 60 y 120 minutos.
7. Ver procedimiento Operación del Horno. POPCM-08.

Transcurrido el tiempo de esterilización apague el interruptor y permita que la temperatura descienda durante 2 horas, hasta aproximadamente de $60 - 70^{\circ}\text{C}$ lo cual podrá verificarse encendiendo nuevamente el interruptor, en caso de que este tiempo no haya sido suficiente para alcanzar este rango de temperatura, deje transcurrir 30 minutos más.

Nota 1: Al introducir el material dentro del equipo hacerlo de forma cuidadosa como lo indica la figura dejando espacios libres.

Nota 2: Es importante no extraer el material a temperatura mayor de este rango para evitar su ruptura con consecuencia del cambio brusco de temperatura.

Identifique el material con la siguiente información:



Nombre del material
Fecha de esterilización
Fecha de caducidad
Nombre del operario

Almacene el material en el área destinada para este fin.

PRUEBAS BIOLÓGICAS.

Prueba de LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus)

Del material estéril retirar el correspondiente al 2 % y aplique a éste la prueba de pirógenos con test LAL:
Sanitice perfectamente el área de trabajo con la solución germicida en turno de acuerdo al programa de Rotación de Germicidas y encienda el mechero.

Del número de piezas esterilizadas tome diferentes muestras cada vez que se lleve a cabo el proceso

Ejemplo: 1 jarra y 1 frasco

1 caja Petri y 1 matraz

1 matraz aforado y 1 frasco.

Adicione 5 ml de agua apirogénica (agua del test LAL) dejando resbalar el agua por las paredes, homogenice la muestra. Tome 0.1 ml de ésta y adicónelos en el tubo previamente preparado con el reactivo de LAL. Ver procedimiento Prueba de Pirógenos al Agua Grado Inyectable. PGNCM-23.

Indicadores biológicos

Los indicadores biológicos que se emplean para el control del proceso de despirogenización son:

Tiras de papel de 4 cm² impregnadas con esporas en sobres individuales de

Microorganismo: *Bacillus subtilis niger* ATCC 9372.

Una vez que se cumple el proceso de esterilización el indicador biológico se coloca en condiciones asépticas en un tubo con 10 ml de caldo de soya tripticaseína. En otro tubo se coloca un indicador biológico que no haya sido esterilizado (testigo positivo).

Se incuban ambos con un tercer tubo (testigo de medio de cultivo) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas



Los indicadores biológicos empleados en el proceso de esterilización no deben desarrollar crecimiento o turbidez al término de su incubación.

VI. DOCUMENTACION.

Todo proceso de despirogenización, deberá registrarse en:

Formato correspondiente.

Bitácora Control de Esterilizaciones en el Horno, anotando los siguientes datos:

Fecha

Carga

Temperatura

Hora de inicio

Hora de término

Resultado

Firma del operador

Firma de verificación

Observaciones

VII. CRITERIO DE ACEPTACION

El ciclo de esterilización cumple sí:

La prueba de pirógenos por LAL cumple satisfactoriamente.

Los indicadores biológicos empleados en el proceso de esterilización muestran resultados satisfactorios (esto se verifica 48 hrs después).

La temperatura registrada en la pantalla digital del panel de control debe ser de $250 \pm 10^\circ\text{C}$ en los tiempos indicados.

VIII. REFERENCIA

FEUM, 6ª Edición (1994) Pág. 135-136.

Guía para el Control Microbiológico de Medicamentos. CIPAM. 1992.





Departamento:	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	Código:
Título: VERIFICACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LOS INDICADORES BIOLÓGICOS		Página 64 de 14
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

ÍNDICE		PÁG.
I	INTRODUCCIÓN	2
II	OBJETIVO	2
III	ALCANCE	2
IV	RESPONSABILIDADES	3
V	MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS	3
VI	PROCEDIMIENTO	4
VII	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	
VIII	FRECUENCIA	
IX	DOCUMENTACIÓN	
X	LISTA DE DISTRIBUCIÓN	



XI	BIBLIOGRAFÍA	12
XII	DIAGRAMA DE FLUJO CUENTA VIAL INICIAL	13
	DIAGRAMA DE FLUJO PUREZA E IDENTIFICACIÓN	14
	ANEXO	i

I INTRODUCCIÓN

1. Un indicador biológico es una preparación caracterizada de un microorganismo específico resistente a un proceso de esterilización particular. Son empleados en la calificación física de equipo de esterilización, para validar procesos de esterilización o bien para evaluar periódicamente los procesos de esterilización de uso habitual.

Los indicadores biológicos empleados en Microbiología según el tipo de esterilización:

- 1.1. Proceso de esterilización por calor seco (horno). Son tiras de papel impregnadas con esporas viables obtenidas a partir de una cepa específica de *Bacillus subtilis* subespecie Níger (ATCC 9372).
- 1.2. Proceso de esterilización por vapor (autoclave). Son preparaciones de esporas viables obtenidas a partir de un cultivo derivado de una cepa específica de *Bacillus stearothermophilus* contenidas en una tira de papel filtro.

II OBJETIVO

1. Contar con un procedimiento que describa la forma correcta de evaluar los indicadores biológicos empleados en los diversos proceso de esterilización, como principal estrategia que permite constatar la eficacia de dicho proceso.

III ALCANCE

1. Este procedimiento aplica para todos los indicadores biológicos empleados en la calificación física de equipo de esterilización, en el desarrollo y establecimiento de un proceso de esterilización validado, bien en la verificación periódica de ciclos de esterilización previamente establecidos y documentados.

IV RESPONSABILIDADES



1. Es responsabilidad del personal técnico y químico del área de Microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del supervisor de Microbiología y el jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, tener conocimiento de este procedimiento.

V MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL

- Tiras bioindicadoras.
- Cajas petri estériles desechables.
- Pinzas.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Mechero.
- Micropipeta.
- Puntas para micropipeta.

EQUIPO

- Vortex.
- Incubadora ajustada a temperatura $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- Incubadora ajustado a temperatura $45\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.
- Microscopio óptico.

REACTIVOS

- Tren de reactivos para tinción de Gram.
- Galerías para pruebas bioquímicas API.

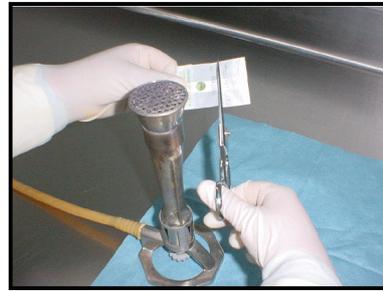
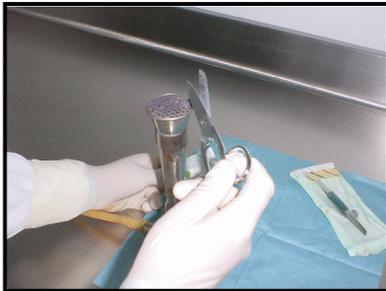


- Reactivos reveladores de galerías API.
- Caldo Soya Trypticaseína.
- Agar Soya Trypticaseína.

VI PROCEDIMIENTO

1.0 Determinación de la cuenta viable inicial en los bioindicadores.

- 1.1. Sanitice el área de trabajo y encienda el mechero.
- 1.2. Tome tres muestras del indicador biológico.
- 1.3. Corte el sobre que contiene la tira de papel, con ayuda de tijeras, previa esterilización a la flama.



- 1.4. Extraiga la tira de papel auxiliándose con una pinza estéril.



- 1.5. Coloque la tira en un tubo que contenga 10 ml de buffer pH 7.2, puede sustituirse por solución salina o agua estéril.



- 1.6. Tape el tubo perfectamente, y deje transcurrir 30 minutos.



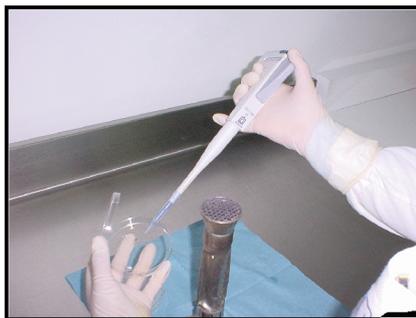
- 1.7. Agite vigorosamente con ayuda de un Vortex, hasta observar la disolución completa del papel y la formación de una suspensión homogénea.



- 1.8. Transfiera 1 ml de la suspensión anterior a 2 tubos estériles y prepare diluciones seriadas en agua estéril o buffer de fosfatos pH 7.2.



- 1.9. Realice diluciones decimales que contengan de 30 a 300 UFC/ml, considerando la concentración reportada por el proveedor.
- 1.10. Siembre 1 ml de cada dilución por duplicado en cajas petri estériles.



- 1.11. Agregue a cada una de las placas aproximadamente 20 ml de Agar Soya Trypticaseína (AST).



1.12. Homogenice y deje solidificar.

A) Tiras de papel con esporas viables para esterilización por vapor.

Incube las cajas en posición invertida a una temperatura de 45 a 50 °C durante 48 horas.

B) Tiras de papel con esporas viables para esterilización por calor seco.

Incube las cajas en posición invertida a una temperatura de 33 a 37 °C durante 48 horas.

1.13. Una vez transcurrido el tiempo de incubación cuente el número de Unidades Formadoras de Colonias por caja y calcule el número promedio de microorganismos, tomando en cuenta la dilución empleada.

2.0 Pruebas de pureza e identificación.

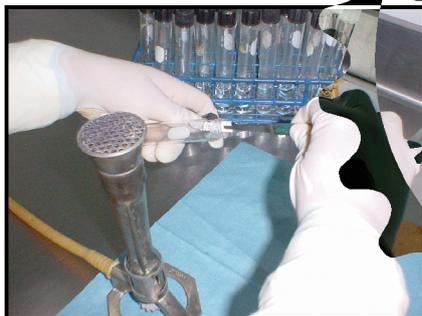
2.1. Sanitice el área de trabajo.

2.1. Encienda el mechero.

2.3. Abra cuidadosamente el sobre que contiene la tira de papel.



2.4. Con ayuda de una pinza esterilizada a la flama, coloque la tira en un tubo con 10 ml de Galdco Goya Tripticaseína.



2.5. Incube a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

2.6. Al finalizar el periodo de incubación realice lo siguiente:

2.6.1. Auxiliándose con una asa bacteriológica, tome una muestra del medio y resiembre en caja petri con Agar Soya Trypticaseína; mediante estría cerrada en caja petri aplicando la técnica de dilución, con el fin de obtener colonias aisladas.



2.6.2. Incube durante 48 horas a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6.3. Al finalizar el tiempo de incubación observe la morfología macroscópica de las colonias y descríbalas.

2.6.4. Identifique mediante una tinción de Gram la morfología microscópica de las colonias.

2.6.5. Identifique al microorganismo observado mediante el empleo de pruebas bioquímicas.



2.7 Testigos negativos.

2.7.1. Lleve a cabo un proceso de esterilización en autoclave o bien en el horno, dependiendo del indicador biológico a evaluar, coloque dentro los bioindicadores junto con una carga normal, de acuerdo a los patrones de carga establecidos.

2.8 Testigos positivos.

2.8.1. En condiciones asépticas coloque el bioindicador dentro de un tubo que contenga 10 ml de Caldo Soya Trypticaseína.

2.8.2. Incube a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

2.8.3. Observe al finalizar el período de incubación.

VII CRITERIO DE ACEPTACIÓN

1. Cada lote de indicadores biológicos es aceptado si cumple con las siguientes características

1.1. INDICADORES BIOLÓGICOS EN TIRAS DE PAPEL PARA ESTERILIZACIÓN POR VAPOR.

Bacillus steanothermophilus ATCC 7953

PRUEBA	ESPECIFICACIÓN
Cuenta viable inicial	El número de esporas por muestra no debe ser menor al indicado en la etiqueta ni mayor al 300% .
Crecimiento de 45 a 50°C	Cumple
Tinción de Gram	Bacilos Gram + con endosporas ovales, subterminales que deforman la célula.



Pruebas Bioquímicas	
Catalasa	+
Citrato	-
Nitritos	+
Gelatina	-
Vogues Proskauer	-
Fructuosa	+
Glucosa	+
Maltosa	+
Testigo positivo	Crecimiento en caldo soya tripticaseína (turbidez)
Testigo negativo (Sometido a esterilización)	Sin crecimiento

1.2. INDICADORES BIOLÓGICOS EN TIRAS DE PAPEL PARA ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO.
Bacillus subtilis subespecie Níger (ATCC 9372)

PRUEBA	ESPECIFICACIÓN
Morfología colonial	Colonias con apariencia opaca y de color crema o ligeramente café.
Cuenta viable inicial	El número de esporas por muestra no debe ser menor al indicado en la etiqueta ni mayor al 300% .
Crecimiento de 30 - 35°C	Cumple
Tinción de Gram	Bacilos Gram + de 0.7 a 0.8 micras de anchura por 2 ó 3 micras de longitud, con endosporas ovales y centrales que no deforman a la célula.



Pruebas Bioquímicas	
Catalasa	+
Citrato	+
Nitritos	+
Gelatina	+
Vogues Proskauer	+
Motilidad	+
Testigo positivo	Crecimiento de 30 - 35°C en Agar Soya Trypticaseína.
Testigo negativo (Sometido a esterilización)	Sin crecimiento

VIII FRECUENCIA

1. Cada vez que ingrese un nuevo lote de indicadores biológicos para esterilización por vapor o calor seco.
2. Cuando se requiera evaluar indicadores biológicos empleados en la calificación de equipos de esterilización dentro de la planta de Producción o del área de Microbiología.

IX DOCUMENTACIÓN

1. Registre en formato correspondiente.

X LISTA DE DISTRIBUCIÓN

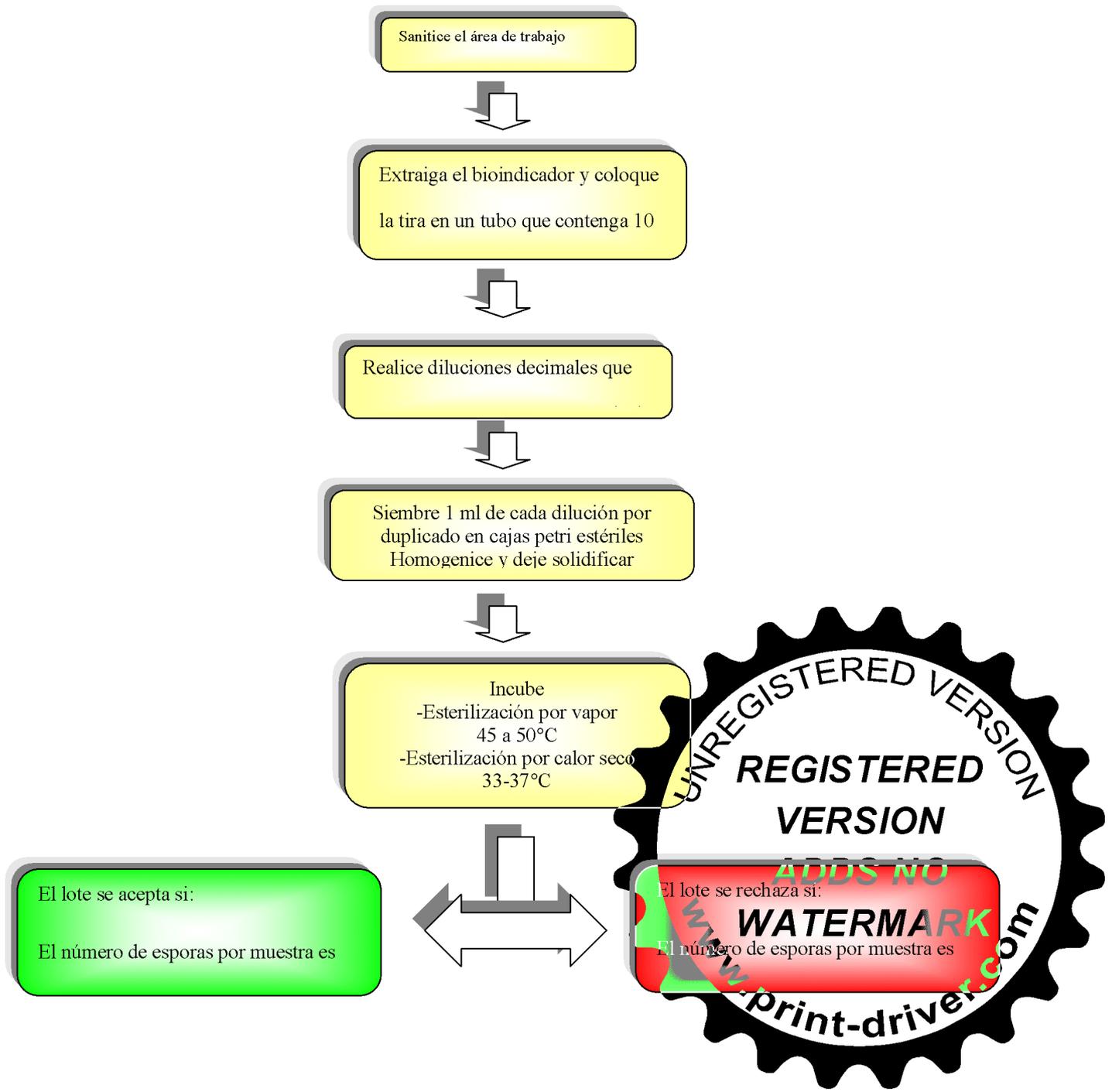
1. Gerencia de Garantía de Calidad.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Microbiología.



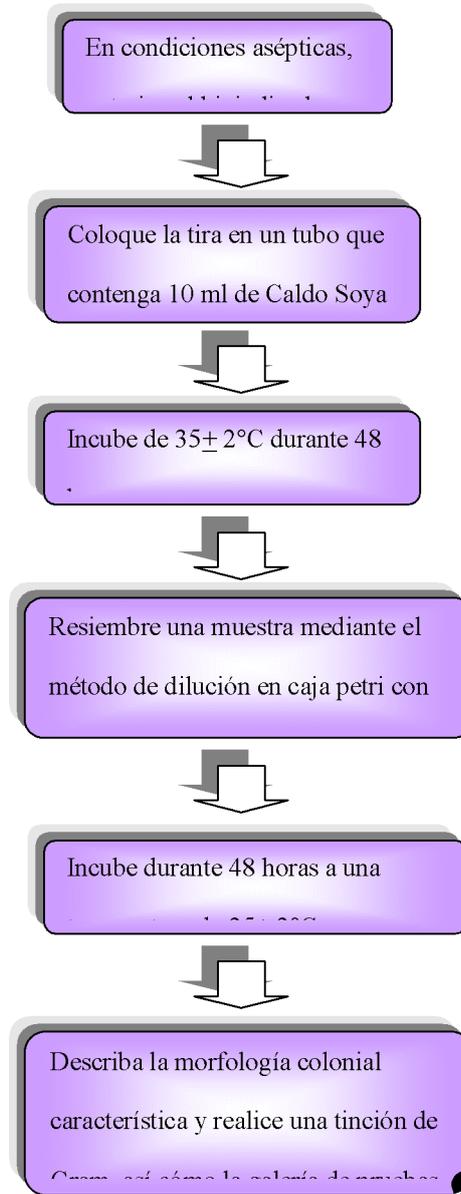
XI BIBLIOGRAFÍA

1. FEUM 7ª Edición, 2000. Pág. 289-296.
2. USP 26 NF 21, 2003. Pág. 2244-2245.

XII DIAGRAMA DE FLUJO CUENTA VIABLE INICIAL



XII DIAGRAMA DE FLUJO PUREZA E IDENTIFICACIÓN



Departamento:	PROCEDIMIENTO GENERAL NORMALIZADO	Código:
Título: VESTIDO Y DESVESTIDO CON EL UNIFORME ESTÉRIL		Página 76 de 7
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

I OBJETIVO

1. Contar con un procedimiento que describa la forma adecuada de vestirse y desvestirse con el uniforme estéril, con el fin de minimizar riesgos de contaminación al ingresar a un área aséptica.

II ALCANCE

1. Aplica al personal que ingresa a una área aséptica en inyectables, hormonales, jeringas prellenadas o en el laboratorio de Microbiología de Importadora y Manufacturera Bruluart.

III PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de calidad.

IV RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico del área de Microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad del Jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleva a cabo de forma correcta.



4. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, tener conocimiento de este procedimiento.

VI PROCEDIMIENTO

Antes de ingresar a cualquier área encargada de la producción de formas farmacéuticas parenterales como líquidos inyectables, hormonales o jeringas prellenadas, deberá:

1. Tener las uñas recortadas, eliminar cualquier tipo de cosmético facial, así como esmalte de uñas, retirar cualquier tipo de alhajas.
2. Bañarse previamente y vestirse con el uniforme establecido en cada departamento esto lo podrá consultar en el procedimiento de flujo de personal de cada área.

A) VESTIDO

1. El personal que ingrese al área aséptica deberá estar calificado previamente por el área de Validación de Procesos y Microbiología de acuerdo al Procedimiento General para calificación del personal que labora en áreas asépticas POPVVP-00.
2. Lave sus manos, brazos a partir de los codos y uñas en el área de lavado con jabón líquido para manos y un cepillo de cerdas, deje secar el agua excedente al aire libre, no utilice ningún aditamento para secarlas ya que puede adherirse partículas en sus manos
3. Humedezca sus manos con alcohol etílico al 70% y deje que se evapore.
4. Ingrese al desvestidor. A partir de este momento se encuentra en un área aséptica por lo que debe emplear un comportamiento adecuado para este tipo de áreas como son los movimientos lentos y precisos y no tener comportamientos innecesarios y nerviosos.
5. Despójese de toda su uniforme y zapatos de trabajo, doblando la ropa hacia adentro evitando caer la contaminación proveniente del contacto con su cuerpo y colóquela en orden en el área asignada, coloque sus zapatos debajo del estante con ayuda de sus pies sin tocarlos con sus manos, no se retire la cofia y cubrebocas.
6. Coloque un par de zapatones desechables estériles.
7. Ingrese al vestidor.
8. Humedezca sus manos con alcohol etílico al 70%.
9. Tome el paquete que contiene el uniforme de su talla revise que la envoltura en donde se encuentra el uniforme no se encuentre dañada, rota o húmeda y observe que haya sido esterilizado mediante el uso de la cinta testigo a un color negro, verifique en la envoltura del uniforme la fecha y hora de esterilización que no debe exceder 24 horas desde su esterilización hasta su uso.
10. Colóquese frente al espejo y observe cuidadosamente la forma de cada una de las componentes del uniforme, para evitar manipularlo innecesariamente y evitar posibles riesgos de contaminación.



11. Coloque el paquete sobre la banca.
12. Abra el paquete del lado del rotulo, por los extremos con todo cuidado de no tocar el contenido.
13. Tome el paquete de guantes que se localiza en la parte superior y trasladelos junto al uniforme y ábralos retirando con todo cuidado el masking tape.
14. Tome con la mano izquierda el guante derecho por el dobléz interno y colóquelo sobre la mano derecha. Con la mano derecha tome el guante izquierdo por el dobléz externo y colóquelo en la mano correspondiente.
15. Humedezca ambas manos con alcohol etílico al 70%
16. Tome la cofia por dentro en la parte de los extremos y en un solo movimiento, colóquela sobre la que trae puesta.
17. Colóquese el cubrebocas sobre el que ya trae puesto, estirando el resorte completamente con una mano y con la otra colocando únicamente el dedo índice y medio en la parte interna, suéltelo una vez que cubra completamente su nariz y boca,.
18. Tome la escafandra por la parte interior y colóquela sobre su cabeza, dejándola caer libremente en sus hombros, debe estar completamente desdoblada, pues de no ser así no cumplirá con la función de proteger al producto de la contaminación.
19. Amarre la escafandra uniendo ambas cintas por la parte de atrás cuidando de no tocar la parte externa .
20. Desdoble el overol, tomándolo por la parte interna correspondiente a la cintura y deje caer libremente la parte inferior.
21. Introduzca una pierna y luego la otra, cuidando que no toque el piso y de no soltarlo durante el proceso.
22. Introduzca la mano derecha en la manga ayudándose con la mano izquierda por la parte interna, posteriormente la mano izquierda en la manga correspondiente.
23. Suba el cuello del overol a su sitio, mediante un movimiento lento tomándolo por la parte interna, cuidando que la escafandra quede en el interior de este.
24. Suba el cierre por completo.
25. Desdoble las extremidades del overol, sin tocar la parte exterior de este.
26. Tome las botas por el dobléz y coloque el pie derecho dentro de la bota que se trae sobre la banca, deshaga el dobléz hasta soltar las primeras cintas que sostendrán la bota a la altura del tobillo, cuidando que estas no toquen ninguna superficie, sujete estas cintas rodeando su tobillo. Suba completamente la bota por la parte interna y sujete las cintas de la parte superior rodeando su pierna, cuidando sea un nudo firme que no permita que se muevan constantemente sin presionarlas evitando que lo lastimen.
27. Doble la envoltura del uniforme en 4 partes lentamente evitando formar turbulencias de jirco expuesta la parte interna de la misma, y trasládela a un extremo de la banca, .



28. Una vez concluido el vestido, tome el par de guantes que se encuentra dentro del paquete del uniforme. Despójese de uno de los guantes empleados para el vestido retirandolos lentamente por la parte externa cada uno de los dedos del guante y coloque un nuevo guante tomándolo por el dobléz, sin tocar la parte externa del mismo, introduzca la mano correspondiente, , despójese del segundo guante que empleo para vestirse, repitiendo el procedimiento anterior, cuidando cubrir con el guante la manga del uniforme.
29. Tome los lentes de seguridad y con ayuda de los dedos índice y pulgar estire completamente el resorte y colóquelos cubriendo sus ojos y cejas sobre la escafandra, de esta forma no se empañaran y cumplirán correctamente su función, suéltelos una vez que hayan sido colocados correctamente.
30. Sanitice los guantes con alcohol etílico al 70%.
31. Colóquese frente al espejo y revise que el vestido sea correcto.
32. Ingrese al área aséptica cuidando cada movimiento para mantener en todo momento el uniforme en condiciones de esterilidad.

B) DESVESTIDO

1. Diríjase al vestidor recoja la envoltura del uniforme
2. Ingrese al desvestidor.
3. Retire lentamente los lentes de seguridad.
4. Desamarre las cintas de la bota derecha y quítesela lentamente doblándolo hacia adentro, realice el mismo procedimiento con la bota izquierda, posteriormente retire los zapatonés desechables y colóquelos dentro de la envoltura del uniforme
5. Baje el cierre del overol y despójese del uniforme sacando los brazos y comience a doblarlo hacia adentro hasta concluir en las extremidades inferiores.
6. Retire los lentes de seguridad.
7. Desamarre las cintas de la escafandra y retírela lentamente por los extremos, solo la parte externa.
8. Coloque dentro de la escafandra el overol y las botas, para llevarlos posteriormente al área aséptica para su lavado.
9. Proceda al vestido con su uniforme de trabajo, cuidando en todo momento la lentitud de sus movimientos y de no sacudir la ropa.
10. Salga del desvestidor, llevando consigo los lentes de seguridad y la envoltura de su uniforme.



11. Dirijase al área de lavado y retire la cofia, cubrebocas y guantes y deséchelos así como la envoltura del uniforme.
12. Sanitice perfectamente los lentes de seguridad con alcohol etílico al 70% ayudándose con un paño estéril y especial para áreas asépticas, colóquelo en la esclusa de luz UV durante 20 minutos.

VII CRITERIO DE ACEPTACIÓN

El presente procedimiento cumple si se lleva a cabo con cada uno de los pasos antes mencionados.

VIII FRECUENCIA

1.Cada vez que ingrese personal a un área aséptica ya sea dentro del área de producción de inyectables, inyectables hormonales, jeringas prellenadas o de Microbiología.

DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Microbiología.

x. BIBLIOGRAFIA

NOM 059. BUENAS PRÁCTICAS PARA LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS



Departamento:	PROCEDIMIENTO GENERAL NORMALIZADO	Código:
Título: EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL PERSONAL EN ÁREAS ASÉPTICAS		Página 81 de 7
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

ÍNDICE	PÁG.
I INTRODUCCIÓN	2
II OBJETIVO	2
III ALCANCE	2
IV PERSONAL INVOLUCRADO	2
V RESPONSABILIDADES	2
VI MATERIAL Y EQUIPO	3
VII PROCEDIMIENTO	
VIII DOCUMENTACIÓN	
IX CRITERIO DE ACEPTACIÓN	
X LISTA DE DISTRIBUCIÓN	



I INTRODUCCIÓN

La fuente más grande de partículas autotransportadas en un área aséptica es el personal, que genera partículas viables y no viables. Por tal motivo el muestreo del personal debe realizarse en puntos estratégicos y posibles de contaminación durante el proceso de envasado con el fin de verificar que el uniforme se mantiene en todo momento estéril y se están aplicando adecuadamente los Procedimientos de vestido y las Buenas prácticas de Manufactura durante el Proceso de envasado. La importancia del personal en el proceso aséptico es ampliamente reconocida por lo cuál se debe poner considerable atención en la competencia de los operadores.

II OBJETIVO

1. Describir la manera de realizar el monitoreo microbiológico al personal con el fin de minimizar riesgos de contaminación dentro de las áreas asépticas en Importadora y Manufacturera Bruluart.

III ALCANCE

1. Este procedimiento aplica a todo el personal de microbiología, inyectables, hormonales y jeringas prellenadas que entran al área aséptica.

IV PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de Calidad.

V RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico de Microbiología conocer y aplicar correctamente este procedimiento.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología y del Jefe de Control de Calidad verificar que se lleve a cabo de forma correcta el presente procedimiento.
3. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad conocer este procedimiento.



VI MATERIAL Y EQUIPO

1. Agar de Soya Trypticaseína (AST)
2. Agar Dextrosa Sabouraud (ADS)
3. Matraz erlenmeyer 1000 ml
4. Agua desmineralizada
5. Autoclave
6. Placas Rodac de AST y ADS
7. Guantes estériles
8. Piceta con Etanol al 70%
9. Contador de colonias
10. Incubadora de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
11. Incubadora para $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
12. Hisopos
13. Tubos con buffer
14. Plumón especial para áreas asépticas.

VII. FRECUENCIA

INYECTABLES: Monitoreo completo del personal una vez durante el envasado.

El segundo monitoreo sólo se muestrea guantes y vientre al personal

MICROBIOLOGÍA: Guantes y vientre durante cada prueba de esterilidad.

HORMONALES: En envasados menores a 12 horas un Monitoreo completo del personal y en envasados mayores a 12 horas realizar un segundo monitoreo de guantes y vientre.

JERINGAS PRELLENADAS: Un monitoreo completo por lote productivo.

VII. PROCEDIMIENTO

7.1 Tome una charola y saniticela con etanol 70%

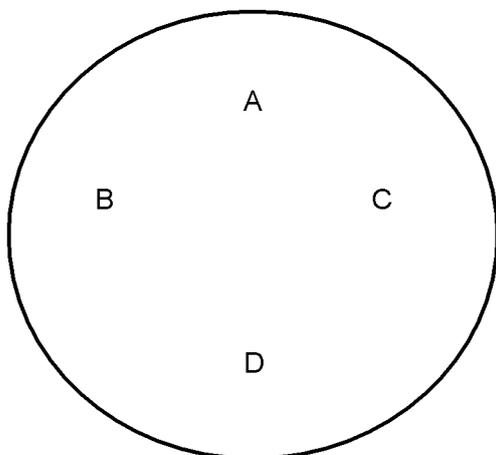
7.2 Coloque los paquetes de placas rodac necesarios para el monitoreo de acuerdo al número de personal y el tipo de monitoreo a realizar, debe verificar que se emita un lote aprobado el lote con la prueba Promoción de crecimiento PGNCM-015/4.

7.3 Elimine la segunda bolsa de cada paquete de placas rodac y sanitice la siguiente con etanol 70%.



- 7.4 Coloque la charola que contiene el material en la trampa de luz U.V. durante 20 minutos. El material se debe ordenar dentro de la trampa de luz UV de manera que quede expuesta toda la superficie de este y si no es posible cambiarlo de posición .
- 7.5 Transcurridos los 20 minutos apague la lampara.
- 7.6 Ingrese al vestidor del área aséptica.
- 7.7 Proceda al vestido con el uniforme estéril aplicando el Procedimiento PGNM-18/2.
- 7.8 Ingrese al área aséptica.
- 7.9 Coloque la charola del material sobre una mesa dentro del área.
- 7.10 Rotule por cada punto una placa RODAC con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), y una placa RODAC con Agar Soya Trypticaseína (AST) con los siguientes datos. Ver figura 1.

FIGURA 1



A) MEDIO DE CULTIVO
 AST.- Agar Soya Trypticaseina
 ADS.- Agar Dextrosa Sabouraud

B) ÁREA
 CAI₁.- Inyectables 1.
 CAI₂.- Inyectables 2.
 CAIH.- Hormonales.
 JPV .-Jeringas prellenadas volteo.
 JPA.- Jeringas prellenadas acomodo.
 JPLL.-J eringas prellenada envasado.

C) INICIALES DEL PERSONAL A MONITOREAR Y PUNTO DE MUESTREO (VER TABLA 1)

D) FECHA

- 7.11 Sanitice perfectamente sus guantes con etanol al 70%.
- 7.12 Para monitorear al personal debe de hacerlo en el orden descrito en la tabla No 1.

TABLA 1. POSICIONES PARA EL MONITOREO DEL PERSONAL

NO. DE POSICIÓN	UB ICACIÓN	ESPECIFICACIÓN
1	Guantes	



2	PUÑOS	<p>BACTERIAS 1 UFC/ 5 cm²</p> <p>AUSENCIA DE HONGOS</p>
3	ANTEBRAZOS	
4	CUELLO	
5	PECHO	
6	VIENTRE	
7	MUSLOS	
8	RODILLAS	
9	TOBILLOS	

7.13 Coloque el rodac con él rotulo hacia abajo sobre la charola.

7.14 Separe cuidadosamente la base del rodac que contiene el agar.

7.15 Tome la placa con ayuda de sus dedos indice y pulgar y colóquela sobre la superficie a monitorear Ver foto 1, no debe ejercer demasiada presión o rotar la placa sobre el uniforme del personal.

7.16 Una vez realizado el monitoreo coloque sus placas en la charola donde las transporte y llévelas al área de microbiología.

7.17 Incube las placas de Agar Soya Trypticaseína a una temperatura de 37 ± 2 °C durante 72 horas y las placas de Agar Dextrosa Sabouraud a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 5 días.

FOTO 1. PERSONAL INDICANDO LOS PUNTOS A MONITOREAR



V. RESULTADOS

1. Durante el período de incubación revise las placas diariamente, utilizando el contador de colonias.
2. Una vez finalizado el periodo de incubación, los resultados obtenidos se reportaran en la bitácora y formato correspondiente.

NOTA: En caso que de los resultados superen el límite de alerta o se encuentre muy cercano a el, aún antes de concluir el periodo de incubación, se debe informar al supervisor del área para que se lleven a cabo las acciones correctivas inmediatas.

VIII DOCUMENTACIÓN

1. Registre en la bitácora correspondiente de acuerdo al área en que se realizo el muestreo.
 - Fecha de exposición
 - Hora de muestreo
 - Fecha de término para AST
 - Fecha de término para ADS
 - Sanitizante / Concentración
 - Analista
 - Personal al que se monitoreo
 - Temperatura y humedad relativa
3. Registre en los formatos correspondientes. Ver anexos

IX CRITERIO DE ACEPTACIÓN

1. El criterio de aceptación del monitoreo se cumple sí:
 - 1.1. Los pasos de operación se siguen al pie de la letra.
 - 1.2. Las placas empleadas para el monitoreo cumplieron con la promoción de cumplimiento.
 - 1.3. Sí los resultados se encuentran dentro de los límites establecido.

X LISTA DE DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Microbiología.



XI BIBLIOGRAFÍA

1. Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Estériles de la Regulación No. 16-2000 Directrices sobre Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos.



Departamento: Control de Calidad	PROCEDIMIENTO GENERAL NORMALIZADO	Código:
Título: MONITOREO AMBIENTAL DEL ÁREA ASÉPTICA DE INYECTABLES		Página 88 de 15
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

ÍNDICE	PÁG.
I INTRODUCCIÓN	2
II OBJETIVO	2
III ALCANCE	2
IV PERSONAL INVOLUCRADO	2
V RESPONSABILIDADES	3
VI MATERIAL Y EQUIPO	3
VII PROCEDIMIENTO	4
VIII RESULTADOS	13
IX DOCUMENTACIÓN	13
X CRITERIO DE ACEPTACIÓN	14
XI LISTA DE DISTRIBUCIÓN	4
XII BIBLIOGRAFÍA	15
XIII ANEXO II. FORMATO DE REPORTE FRINYHCM-048	i
XIV ANEXO III. FORMATO DE REPORTE FRINYHCM-049	ii
XV ANEXO IV. FORMATO DE REPORTE FRINYHCM-54	iii



I. INTRODUCCIÓN

El monitoreo o vigilancia microbiológica es la medición u observación programada que debe realizarse en los diversos puntos de un área ya que son elementos esenciales de un programa de control que proporciona datos para identificar los factores que contribuyen en los procesos de contaminación y una vez identificado el problema instituir medidas apropiadas y evaluar su eficacia. La vigilancia ambiental microbiológica del área tendrá en cuenta el muestreo del aire, superficies y por exposición placa. Se tendrá en cuenta que su utilización no interfiera con la protección de la operación.

También interviene lo que se conoce como límites críticos, los cuales son niveles o tolerancias prescritas que no deben superarse para asegurar que existe un control efectivo.

Por otra parte, las medidas preventivas están asociadas a esos límites críticos que funcionan como frontera de seguridad.

Lo importante del monitoreo ambiental es que la vigilancia proporcione esta información a tiempo para que se adopten medidas correctivas con el objeto de recuperar el control del proceso antes de que sea necesario rechazar el producto.

II. OBJETIVO

Contar con un procedimiento que describa la manera de realizar el monitoreo ambiental dentro del área aséptica

III. ALCANCE

1. Este procedimiento aplica a todo el personal de microbiología y del área de inyectables hormonales que ingrese al área aséptica de dicho departamento.

IV. PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de Calidad.



V. RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico de Microbiología así como el Operativo del área de inyectables hormonales conocer y aplicar correctamente este procedimiento.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología y del Jefe de Control de Calidad verificar que se lleve a cabo de forma correcta el presente procedimiento.
3. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, conocer este procedimiento.

VI. MATERIAL Y EQUIPO

- Uniforme estéril.
- Placas con Agar Soya Trypticaseína (AST) y Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Preparación de medios según el procedimiento PGNCM-007/3.
- Placas tipo RODAC con Agar Soya Trypticaseína y Agar Dextrosa Sabouraud.
- Hisopos.
- Tubos con solución buffer pH 7.2.
- Guantes.
- Charolas.
- Cilindros portadores de placas.
- Sanitizante en turno.
- Etanol al 70 %.
- Centrífugo de aire.
- Incubadora.
- Lenzos estériles.
- Tripie.
- Cajas petri estériles desechable



VII. PROCEDIMIENTO

1. TIPOS DE MONITOREO

TIPO	FRECUENCIA
Exposición de placa	2 exposiciones por lote productivo
Superficies	2 veces por semana
Aire	2 exposiciones por lote productivo

NOTA: Cuando no haya producto en proceso únicamente se realiza monitoreo por exposición de placa.

2. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL EMPLEADO PARA MONITOREAR

2.1. MONITOREO POR EXPOSICIÓN DE PLACA

a) Tome de las placas de Agar Soya Trypticaseína y de Agar Dextrosa Sabouraud necesarias para realizar la exposición.

b) Rotule las placas colocando la siguiente información con un plumón indeleble. Ver figura 1.

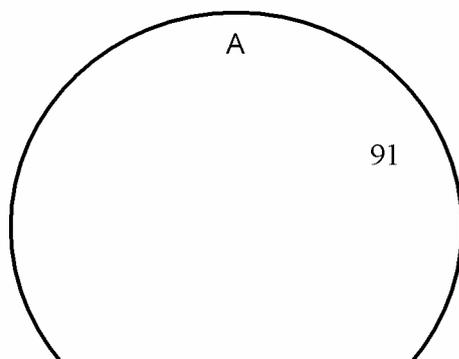




FIGURA 1

- c) Determine el número de posición de acuerdo al formato de reporte del control ambiental de inyectables hormonales (FRINYHCM-048).
- d) Deposite las placas previamente rotuladas en cilindros estériles. Los cuales deben abrirse en presencia de un mechero encendido para crear un ambiente estéril.

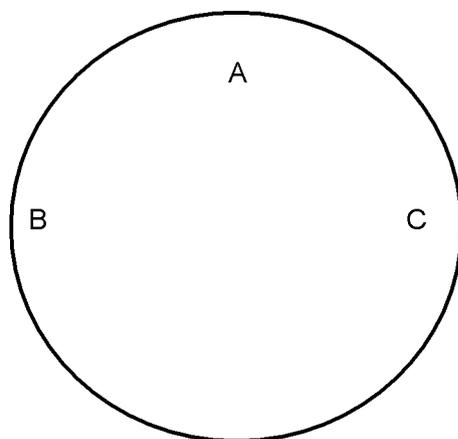
2.2. MONITOREO DE AIRE:

a) Prepare el siguiente material:

- Placas con Agar Soya Trypticaseína y con Agar Dextrosa Sabouraud. Preparación de medios según el procedimiento PGNCM – 0073.
- Centrífugo de aire (AIR IDEAL)
- Rejilla estéril

NOTA: Verifique que las placas con medio de cultivo a emplear tengan lote de preparación vigente y que no muestren deshidratación.

b) Rotule la tapa de la placa de la siguiente forma. Ver figura 2.



D

FIGURA 2

c) Determine el número de posición de acuerdo al formato de reporte del control ambiental de inyectables Hormonales (FRINYHCM-049).

2.3. MONITOREO DE SUPERFICIES

2.3.1. MONITOREO DE POR PLACA RODAC.

a) Rotule una placa RODAC con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), y una placa RODAC con Agar Soya Trypticaseína (AST) con los siguientes datos. Ver figura 3.

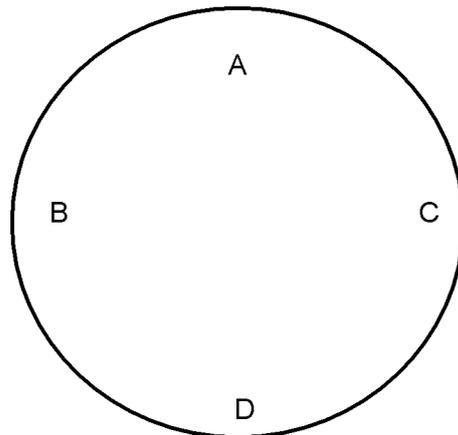


FIGURA 3

A) MEDIO DE CULTIVO
AST: Agar Soya Trypticaseína
ADS: Agar Dextrosa Sabouraud

B) ÁREA
CAINY H: INYECTABLES
HORMONALES

C) No. POSICIÓN

D) FECHA

b) Determine el número de posición de acuerdo al formato de reporte del control ambiental de inyectables hormonales (FRINYGCM-054).

NOTA: Verifique que las placas tipo RODAC empleadas cumplan con la prueba de promoción de crecimiento y se encuentren vigentes.

2.3.2. MUESTREO DE POR HISOPO



Este tipo de monitoreo se lleva a cabo en aquellas superficies irregulares o de difícil acceso.

a) Rotule tubos de ensayo con 9 ml de buffer pH= 7.2, con la siguiente información:

- Área
- Posición
- Fecha

b) Sanitice los tubos perfectamente y colóquelos en una gradilla previamente sanitizada así como una bolsa que contenga hisopos estériles.

c) Acomode todo el material en charolas previamente sanitizadas con etanol al 70%.

3. OPERACIÓN

a) Una vez acondicionado todo el material diríjase hacia el área de inyectables.

b) Sanitice nuevamente el exterior de la charolas y cilindros; colóquelos dentro de la trampa de luz UV, con un tiempo de exposición de 30 minutos.

c) Transcurrido el tiempo de exposición, tome las placas marcadas como vestidor y desvestidor.

d) Conforme va entrando al área coloque las placas de desvestidor y vestidor.

e) Colóquese el uniforme estéril dentro del área de vestidor de acuerdo al procedimiento PGNM –18 y realice posteriormente la evaluación del vestido de todo el personal que ingrese al área según el PGNM-39 . VER FOTO 2.



FOTO 2

f) Una vez dentro del área diríjase a la trampa de luz UV y saque el material restante.



3.1 MONITOREO POR EXPOSICIÓN DE PLACA

a) Sanitice sus guantes con etanol al 70% y coloque las placas en los sitios de exposición correspondientes (Ver formatos). El tiempo de exposición debe de ser de 60 minutos. VER FOTO 3.



FOTO 3

- b) Una vez transcurridos los tiempos de exposición proceda a recoger las placas comenzando por las primeras que coloco y así sucesivamente.
- c) Coloque todas las placas (excepto vestidor y desvestidor) en los cilindros donde las transporto.

Nota: Al realizar estos pasos evite realizar movimientos bruscos para no causar turbulencias.

3.2. MONITOREO DE AIRE:

- a) Programe el centrífugo de aire con la cantidad deseada a monitorear. Procedimiento POPCM-003.
- b) Mientras transcurre el tiempo de exposición de las placas, coloque el triple con el centrífugo debajo del Filtro del techo con una placa Agar Soya Trypticaseína (AST), por 5 minutos. VER FOTO 4.





Foto 4

- c) Transcurridos los 5 minutos realice la misma operación esta vez utilizando una placa de Agar Dextrosa Sabouraud. (Ver formato FRINYHCM-049).
- d) Una vez que haya monitoreado todos los filtros presentes dentro del área, de acuerdo a la secuencia de posiciones en el formato correspondiente, coloquelas en la charola donde las transporte.

3.3. MONITOREO DE SUPERFICIES

Concluído el monitoreo del centrífugo de aire, proceda a realizar el monitoreo de superficies.

3.3.1 MUESTREO CON PLACA RODAC

- a) Sanitice sus guantes con etanol al 70%.
- b) Tome una placa RODAC, separe la tapa y tómelas por los bordes, presiónes una sola vez en la superficie
- a muestrear, de manera que el agar haga contacto total con ésta. (No ejerza demasiada presión sobre



la placa). VER FOTO 5.



- c) Tape la placa de contacto, con cuidado de no tocar la superficie del agar.
- d) Con un lienzo estéril impregnado con etanol al 70%, limpie la superficie que muestreo, para eliminar los posibles residuos del agar.
- e) Deposite las placas de contacto nuevamente en la charola.

3.3.2. MONITOREO CON HISOPO

- a) Sanitice sus guantes con etanol al 70%.
- b) Abra la bolsa que contienen los hisopos, extraiga uno e introdúzcalo en un tubo que contenga 9 ml de buffer pH =7.2, saque el hisopo húmedo y realice el muestreo en una superficie de aproximadamente 5 X 5 cm en el punto establecido.
- b) Una vez efectuado el muestreo, introduzca el hisopo en el tubo y tápelo nuevamente, con la mayor precisión posible con el fin de evitar toda posibilidad de contaminación externa.

4. ANÁLISIS

- a) Una vez recolectado todo el material empleado para el monitoreo, proceda a salir del área junto con éste para su posterior análisis.
- b) Al salir del área recoja la placa de vestidor y una vez cambiado (a) la de desvestidor; dépositelas en la misma charola con el resto del material.
- c) Lleve las placas al área de Microbiología para incubar a temperatura adecuada.



Para las placas con Agar Soya Trypticaseína (AST) 35°C +/- 2°C por 72 horas y para las de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) 25 °C +/- 2° C por un tiempo de 5 días.

d) Para los hisopos:

- ❖ Una vez que los hisopos han sido trasladados al área de microbiología, proceda a analizarlos en el área de la campana de flujo laminar.
- ❖ Tome uno de los tubos con buffer y con el hisopo que empleo para monitorear la superficie y vacíe 2ml por cuadruplicado a cajas petri estériles desechables.
- ❖ A dos placas vacíe aproximadamente 15ml de Agar Soya Trypticaseína (AST) y a las otras 2 restantes vacíe Agar Dextrosa Sabouraud (ADS).
- ❖ Una vez solidificado el medio lleve a incubar las placas a 25°C ± 2 para ADS y a 37°C ± 2 para AST.
- ❖ Transcurrido el tiempo de incubación proceda a leer el número de UFC (Unidad Formadora de Colonias) presentes con ayuda del contador de colonias.

NOTA: Todas las placas del monitoreo se leen diariamente.

VIII. RESULTADOS

1. Durante la lectura diaria de placas verifique los resultados contra las especificaciones indicadas para cada tipo de monitoreo.
2. Las UFC/m³ a reportar en las placas de monitoreo ambiental por centrífugo de aire se reportan utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/m}^3 = \text{UFC/Placa} \times 2$$

3. En caso que de los resultados superen el límite de alerta o se encuentre muy cercano a él, 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 tomen las acciones correctivas inmediatas. Estas consisten en enviar un memorándum de alerta (anexando el reporte de control ambiental del área involucrada); el cual deberá estar firmado por el supervisor de Microbiología y el Gerente de Control de Calidad. Se sugieren acciones correctivas a realizar con el fin de erradicar el problema y que se mantenga dentro de especificaciones microbiológicas.



4. Por su parte el área de microbiología iniciará la identificación de los microorganismos presentes, ó consultará el catálogo de la Microbiota para aquellos que han sido identificados con la finalidad de descartar la presencia de microorganismos patógenos.

IX . DOCUMENTACIÓN

1. Una vez concluído el monitoreo ambiental del área, registre en la bitácora No. 39 "Control Ambiental de Inyectables Hormonales ", así como en el formato correspondiente.

- ❖ FECHA DE EXPOSICIÓN
- ❖ FECHA DE TÉRMINO PARA AST
- ❖ FECHA DE TÉRMINO PARA ADS
- ❖ SANITIZANTE Y CONCENTRACIÓN
- ❖ TIPO DE MONITOREO
- ❖ LOTE DE PREPARACIÓN DE MEDIOS
- ❖ PRODUCTO Y NÚMERO DE LOTE
- ❖ HORA DE MUESTREO
- ❖ TEMPERATURA Y HUMEDAD DEL ÁREA
- ❖ ANALISTA

2. Finalizado el tiempo de incubación, registre los resultados en la bitácora y formatos correspondientes.

El supervisor y los Químicos encargados del área de microbiología firmarán éstos formatos para entregarlos al área de inyectables.

X. CRITERIO DE ACEPTACIÓN

1. El criterio de aceptación del monitoreo se cumple sí:
 - 1.1. Los pasos de operación se siguen al pie de la letra.
 - 1.2. El centrífugo de aire está calibrado y en buen estado.
 - 1.3. Las placas con medio de cultivo y las placas RODACS surten en la promoción de crecimiento y están vigentes.
 - 1.4. El uniforme empleado para ingresar al área cumple lo indicado en el PGNCIM.
- 18

XI. LISTA DE DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad.
1. Jefatura de Control de Calidad.



2. Microbiología

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Estériles de la Regulación No. 16-2000 Directrices sobre Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos.
2. NOM 059 -SSA1-1993.



Departamento: Control de Calidad	PROCEDIMIENTO GENERAL NORMALIZADO	Código:
Título: DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS A PRODUCTO TERMINADO POR EL MÉTODO DE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS (LAL)		Página 101 de 12
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

I. INTRODUCCIÓN

El ensayo de pirógenos mediante la prueba de LAL constituye uno de los principales análisis en el control de calidad de la fabricación de inyectables por su repercusión en la salud del paciente, puesto que la presencia y administración de los mismos, es capaz de provocar una serie de respuestas fisiológicas de carácter perjudicial y en casos extremos la muerte del paciente. El ensayo de de LAL se aplica a la determinación o cuantificación de endotoxinas provenientes de las bacterias Gram negativas, empleando como reactivo , lisado de amebocitos circulantes del cangrejo herradura de *Limulus polyphemus* (Ensayo LAL) O *Tachypleus tridentatus*. Cuando se enfrenta el reactivo a soluciones que contienen endotoxinas produce gelificación. La reacción requiere la presencia de cationes bivalentes, la reacción depende de factores como el pH, temperatura determinante. El lisado contiene un sistema enzimático que actúa en cascada y que se activa progresivamente en presencia de endotoxinas. Como resultado final, la proteína coagulable (coagulígeno) se transforma en un gel (coagulina), siendo este el fundamento de la prueba de LAL. Existen dos métodos para relajar dicha determinación uno es el método turbidimétrico que permite cuantificar la cantidad de endotoxina a partir de la cual se va formando el gel y el método cromogénico basado en el uso de un péptido sintético que contiene un cromógeno, el cual proporciona un valor cuantitativo. El método de gel – clot es un ensayo límite y como método semicuantitativo.



II. OBJETIVO

Contar con un procedimiento que describa la técnica a seguir y cuidados requeridos para comprobar la apirogénicidad de los medicamentos cuya vía de administración es parenteral (inyectables), utilizando el ensayo de LAL por método de gelificación como prueba determinante para verificar tal condición.

III. ALCANCE

1. Aplica a todo Producto terminado de medicamentos inyectables que ingrese al área de Microbiología.

IV. PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de calidad.

V. RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico del área de Microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad del Jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleva a cabo de forma correcta.
4. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, tener conocimiento de este procedimiento.

VI. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

- Jeringas estériles y apirogénicas
- Tubos apirógenicos
- Frascos apirogénicos
- Gradilla para tubos apirogénicos



- Reactivo Test LAL
- Agua apirogénica
- Acido clorhidrico 01N
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Incubadora a 37 ± 2 °C

VII. PROCEDIMIENTO

1. Cálculo de la máxima dilución valida

La máxima dilución valida (MDV) es la dilución máxima permitida de una muestra en la que el límite de endotoxina puede determinarse, para lo cuál se debe aplicar la siguiente fórmula.

$$MDV = \frac{LE \times C}{\lambda}$$

Donde:

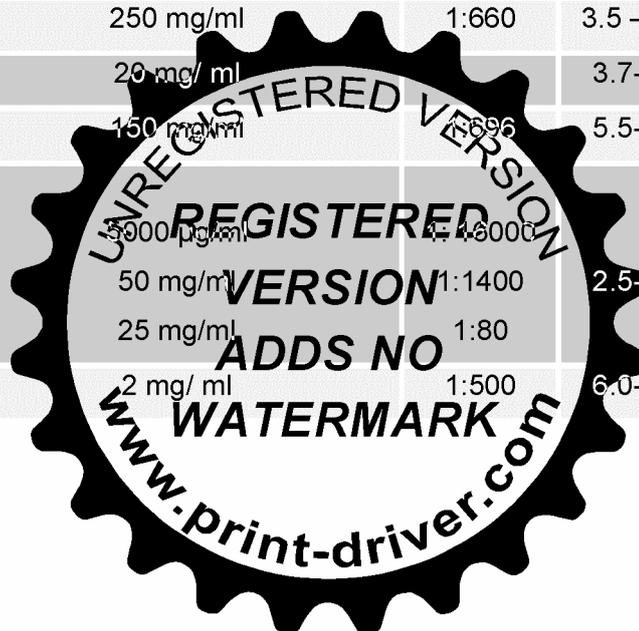
LE = Limite de endotoxina especificado en la monografía del Producto

C = Concentración del producto en la solución de prueba

λ = Sensibilidad del reactivo de LAL

Tabla 1

PRODUCTO INYECTABLE	LIMITE	CONCENTRACIÓN PRINCIPIO ACTIVO	MDV	pH
Agua grado inyectable 2,6,4,5,8,10 ml	0.25 UE/ml	N/A	N/A	
Amikacina 100	0.33 UE/mg	50 mg/ml	1:132	3.5 – 5.5
Amikacina 500	0.33 UE/mg	250 mg/ml	1:660	3.5 – 5.5
Butilhioscina		20 mg/ ml		3.7-5.5
Clindamicina	0.58 UE/mg	150 mg/ml	1:696	5.5-7.0
Complejo B				
Hidroxocobalamina	0.4 UE/ μ g	5000 μ g/ml	1:16000	
Tiamina	3.5 UE/mg	50 mg/ml	1:1400	2.5-4.5
Piridoxina	0.4 UE/mg	25 mg/ml	1:80	
Dexametasona/	31.3 UE/mg	2 mg/ ml	1:500	6.0-8.0



Lidocaina		15 mg/ml		
Dexametasona	31.3UE/mg	4 mg / ml	1:1001	7.0-8.5
Diclofenaco	4.66 UE/mg	25mg/ml	1:932	7.8-9.0
Floroglucinol/ Trimetilfluroglucinol		20 mg/ml 0.02 mg/ml	*	4-6
Gentamicina 20	1.7 UE/mg	10 mg/ml	1:136	3-5.5
Gentamicina 80	1.7 UE/mg	40 mg/ml	1:544	3-5.5
Gentamicina 160	1.7 UE/mg	80 mg/ml	1:088	3-5.5
Lidocaina	1.25 UE/mg	10 mg / ml	N/A	5-7
Metamizol sodico	0.0625 UE/mg	0.5 mg/ml	N/A	5-8.5

2. Dependiendo del producto que se va a evaluar se deben de realizar una serie de diluciones cómo indica la siguiente tabla.

TABLA II

PRODUCTO	DILUCIONES
Agua grado inyectable 2,6,4,5,8,10 ml	N/A
Amikacina 100	0.2-5 0.1-0.5
Amikacina 500	0.1-2.5 0.1-2.5
Butilioscina	N/A
Clindamicina	0.1-2.5 0.1-2.5
Complejo B	0.3-3 0.1-3 0.1-5
Dexametasona	0.1-1.0



	0.1 -1.0
	0.1-1.0
Diclofenaco	*
Floroglucinol/ Trimetilfluroglucinol	N/A
Gentamicina 20	0.2-5 0.1-5
Gentamicina 80	0.1-4 0.1-5 2-5
Gentamicina 160	0.1-1.0 0.1-1.0 0.1-1.0
Lidocaina	N/A
Metamizol sodico	N/A

* DICLOFENACO SÓDICO SOL. INY

Prepare la solución S.A de tris (hidroximetil) amino metano 0.1 M pH = 7.02

Pesar 24.2 g de tris (hidroximetil) amino metano, pasar a un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver y llevar al aforo con agua libre de pirógenos y mezclar. Combine 125 ml de la solución con 109.5 ml de SV de ácido clorhídrico 0.2 N y 15.5 ml de agua libre de pirógenos y mezclar.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Mezcle el contenido de 10 ampolletas, en un frasco apirogenico, pasar el equivalente a 25 mg (1 ml) de diclofenaco sódico a un matraz volumétrico de 200 ml llevar al aforo con la solución Ay mezclar verificar el pH de 7.2

3. Sanitice perfectamente el área de trabajo
4. Colóquese un par de guantes estériles y lentes de seguridad
5. Encienda el mechero
6. Rotule un frasco apirogénico con el nombre y lote del producto a evaluar
7. Rotule 3 tubos apirogenicos:
 - Testigo Positivo (+)



- Testigo negativo (-)
- Muestra (nombre y lote del producto)

8. Reconstituya el reactivo de LAL de la siguiente forma:

8.1 Tome un frasco de agua libre de pirógenos, quite la tapa metálica cuidadosamente y con ayuda de un algodón impregnado con alcohol etílico al 70% limpie la parte superior y esterilice a la flama, realice lo mismo con el reactivo de LAL.

8.2 Con ayuda de una jeringa estéril y apirogénica tome el volumen de agua apirogénica especificado en el marbete del frasco del reactivo y deposítelos dentro del frasco de reactivo de LAL cuidando que el líquido fluya lentamente y por las paredes.

8.3 Homogeneice con movimientos suaves, no agite y evite en todo momento la formación de espuma.

9. Reconstituya el control estándar de endotoxina de la siguiente manera:

9.1 Esterilice a la flama un frasco de agua apirogénica, así cómo el frasco de control estándar de endotoxina

9.2 Agregue la cantidad de agua especificado en el certificado del fabricante

9.3 Agite vigorosamente sin interrupción en un agitador tipo vortex por 30 minutos.

9.4 Realizar la serie de diluciones requeridas para obtener la concentración de 0.125 UE/ml .

9.5 Cada reactivo a utilizar en la prueba debe mantener una temperatura de 20-25°C

10. Prepare la muestra de la siguiente manera:

10.1 Sanitice con alcohol etílico al 70% 10 ampolletas del producto a evaluar por la parte externa.

10.2 Rompa cada ampolleta con ayuda de un rompeampolletas

10.3 Mezcle el contenido de las 10 ampolletas dentro de un frasco apirogénico.

11. Determine el pH de la muestra después de realizar las series de diluciones indicadas para cada producto con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1

12. Rotule 3 tubos apirogénico cómo:

- Testigo Positivo
- Testigo Negativo
- Muestra

13. Coloque 0.1 ml de reactivo de LAL a cada tubo

14. Al tubo rotulado cómo muestra, agregue 0.1 ml de la última dilución realizada en las paredes del tubo.



15. El testigo positivo se le agrega 0.1 ml de endotoxina cómo se establece en el punto 9.
16. El tubo rotulado cómo testigo negativo se le adiciona 0.1 ml de agua apirogénica.
17. Incube los tubos a una temperatura de 37 ± 1 °C durante 60 + 2 minutos, evitando vibraciones, mantener en reposo absoluto todo el tiempo de análisis.

NOTA: Todo el material que se emplee en la prueba debe estar libre de pirógenos, utilizar ciclos de despirogenización a una temperatura no menor a 250°C, los tiempos y temperatura deben ser los establecidos en el protocolo de validación.

VIII. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Al finalizar la incubación. Tome cada uno de los tubos e inviértalos 180°
- 1.2 Un resultado (+) se caracteriza por la formación de un gel firme adherido al fondo del tubo, que mantiene su integridad completa al invertir el tubo.
- 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.

IX: REGISTRO

1. Realice el registro en la bitácora 51 Prueba de LAL con los siguientes datos:
 - Fecha
 - Nombre del producto
 - Lote
 - Dilución
 - Lote LAL
 - Lote endotoxina
 - Resultado
 - Testigo negativo
 - Testigo positivo
 - Analista
 - Observaciones

VIII FRECUENCIA



1. Cada vez que ingrese personal a un área aséptica ya sea dentro del área de producción de inyectables o de Microbiología.

DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Microbiología.



Departamento: Control de Calidad	PROCEDIMIENTO GENERAL NORMALIZADO	Código:
Título: PRUEBA DE LAL RELIZADA A MATERIAL DE EMPAQUE		Página 109 de 8
En vigor:	Sustituye a:	Próxima revisión:
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:

II. OBJETIVO

Contar con un procedimiento que describa la manera adecuada de detectar la posible presencia de endotoxinas mediante la prueba in vitro de gelificación LAL.

III. ALCANCE

1. Aplica al material de empaque estéril cuya especificación así lo indiquen que ingrese al laboratorio de Microbiología.

IV. PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de calidad.

V. RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico del área de Microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad del Jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleva a cabo de forma correcta.
4. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, tener el procedimiento de este procedimiento.



VI. MATERIAL

EQUIPO

- Incubador ajustado a una temperatura de $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$

MATERIAL

- Frascos o viales apirogénicos
- Mechero
- Gasas
- Tubos de ensayo apirogénicos
- Algodón
- Jeringas de 1 ml estériles

REACTIVOS

- Agua apirogénica
- Alcohol etílico 70%
- Test LAL (Reactivo limulus, endotoxina)

VII. PROCEDIMIENTO

1. Sanitice perfectamente el área de trabajo.
2. Encienda el mechero.
3. Verifique que el reactivo de LAL a utilizar este aprobado, de acuerdo al procedimiento de Verificación de sensibilidad del reactivo LAL PGNCM – 016/3.
4. Reconstituya el reactivo de LAL de la siguiente forma:
 - 4.1 Tome un frasco de agua apirogénica, quite la tapa metálica cuidadosamente y con la ayuda de un algodón impregnado con etanol al 70% limpie la parte superior y sanitice a la flama, repita lo mismo con el frasco de reactivo de LAL.
 - 4.2 Con ayuda de una jeringa tome 5.2 ml de agua apirogénica e incorpórela dentro dentro del vial que contiene el reactivo de LAL(Este volumen de agua apirogénica aplica a



un reactivo de LAL para realizar 50 pruebas).

- 4.3 Homogeneice con movimientos suaves, no agite y evite la formación de espuma.

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

- 5.1 Esterilice a la flama un frasco de agua apirogénica, así como el frasco de control estándar de endotoxina.



5.2 Agregue la cantidad de agua apirogénica indicada en el certificado del proveedor.

5.3 Agite con ayuda del vortex durante 15 minutos.



6. Prepare las muestras a analizar dependiendo si es una jeringa o una ampolleta.

6.1 **Jeringa estéril**

6.1.1 Tome 10 jeringas sanitice la envoltura con ayuda de una gasa impregnada con alcohol.

6.1.2 Saque de su envoltura cerca del mechero.

6.1.3 Esterilice a la flama un frasco de agua apirogénica.

6.1.4 Tome el volumen de agua apirogénica necesario para llenar a su máxima capacidad cada jeringa.

6.1.5 Realice por lo menos dos enjuagues a cada una de las jeringas y transfiera el contenido en un frasco apirogénico perfectamente rotulado con los siguientes datos:

- Nombre del material de empaque
- Lote de proveedor
- Número de control
- Fecha de análisis
- Analista

6.2 **Ampolleta estéril**

6.2.1 Tome 10 ampolletas y con gasa impregnada con alcohol etílico al 70% sanitice externamente cada una.

6.2.3 Con un rompe ampolletas, ábralas cerca del mechero.

6.2.4 Esterilice a la flama la tapa del frasco que contiene el agua apirogénica y tome el volumen requerido según la capacidad de la ampolleta.

6.2.5 Transfiera el contenido del agua apirogénica por las paredes de la ampolleta y enjuague por lo menos 2 veces cada ampolleta a analizar.

6.2.6 Recolecte el agua empleada en cada enjuague en un frasco apirogénico previamente identificado con los siguientes datos:

- Nombre del material de empaque
- Lote de proveedor
- Número de control
- Fecha de análisis



- Analista

7. Rotule 5 tubos apirogénicos de la siguiente forma:

- Testigo positivo (+)
- Testigo negativo (-)
- Muestra 1 (Nombre y número de control del material de empaque)
- Muestra 2 (Nombre y número de control del material de empaque)
- Muestra 3 (Nombre y número de control del material de empaque)

8. A cada uno de los 5 tubos previamente rotulados adicione 0.1 ml de reactivo de LAL.



9. Prepare el testigo negativo adicionando 0.1 ml de agua apirogénica.

10. Agregue al tubo rotulado cómo testigo positivo 0.1 ml de endotoxina previamente reconstituida.

11. A cada uno de los tubos rotulados cómo muestra adicione 0.1 ml del agua apirogénica recolectada de los enjuagues realizados al material de empaque a analizar.

12. Homogeneice cada tubo con movimientos suaves.

13. Incube todos los tubos en un incubador ajustado a $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ durante 60 minutos, evitando vibraciones y mantener reposo absoluto durante el tiempo de análisis.

NOTA: Todo el material que emplee en la prueba, debe estar libre de pirógenos.

VII. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Al finalizar el tiempo de incubación. Tome cada uno de los tubos e inviértalos 180°C .

1.2. Un resultado (+) se caracteriza por la formación de un gel firme adherido al fondo del tubo, que mantiene su integridad cuando se invierte el tubo. Compare con el

Testigo positivo cada muestra.

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.





IX. CRITERIO DE ACEPTACIÓN

1. El presente procedimiento cumple si se siguen adecuadamente cada uno de los pasos antes mencionados.
2. El material de empaque analizado se acepta sí:
 - 2.1 El testigo positivo se observa cómo un gel firme que no se rompe al invertir el tubo 180°C.
 - 2.2 El testigo negativo es una masa viscosa o una solución acuosa que no mantiene su integridad al invertir el tubo.
 - 2.3 Sí el análisis de la muestra realizado por triplicado muestra la ausencia de un gel firme al invertir el tubo, mostrando un resultado negativo.

X. LISTA DE DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Personal de Microbiología.

XI. REFERENCIAS

1. Especificaciones internas
2. Indicaciones del proveedor



I. INTRODUCCIÓN

El ensayo de esterilidad aplicado al producto Terminado deberá considerarse sólo cómo la última de una serie de medidas de control mediante las que se garantiza la esterilidad. Las muestras que se tomen para la esterilidad deberán ser representativas de un conjunto del lote, pero entre ellas deberán incluirse especialmente las tomadas de las partes del lote que se consideren con mayor riesgo de contaminación, durante cada proceso particular. Considerando la definición de esterilidad, cómo la ausencia total de organismos vivos, esta es una condición fundamental para productos que son ingresados al organismo vía parenteral, aquellos medicamentos inyectables o bien los materiales de empaque primarios. La prueba de esterilidad se fundamenta en la detección de formas viables de microorganismos en medios de cultivo adecuados para crecimiento bacterias, hongos y levaduras que se pueden encontrar como contaminantes en sustancias, preparaciones y materia prima estériles.

II. OBJETIVO

Asegurar que las materias primas, material de empaque primario o productos inyectables cumplen con la ausencia de microorganismos viables mediante la inoculación del material



de interés en medios de cultivo adecuados para el cultivo de bacterias y hongos, confirmando de esta manera la esterilidad de todos los productos parenterales fabricados en Importadora y Manufacturera Bruluart.

III. ALCANCE

1. Aplica a materia prima y material de empaque cuyo certificado respalde su condición de esterilidad; así cómo a todos los medicamentos parenterales en su presentación Producto Intermedio, Producto Terminado a granel.

IV PERSONAL INVOLUCRADO

1. Microbiología.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Gerencia de Garantía de calidad.

V RESPONSABILIDADES

1. Es responsabilidad del personal Técnico y Químico del área de Microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.
2. Es responsabilidad del Supervisor de Microbiología verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.
3. Es responsabilidad del Jefe de Control de Calidad verificar que este procedimiento se lleva a cabo de forma correcta.
4. Es responsabilidad de la Gerencia de Garantía de Calidad, tener presente este procedimiento.



VI. MATERIAL, EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

MATERIAL

A) MÉTODO DIRECTO

- Pinzas estériles

B) MÉTODO DE FILTRACIÓN

- Equipo de filtración
- Membranas estériles de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0.2 micras con un diámetro de 47 mm.
- Filtros estériles.
- Pinzas de acero inoxidable estériles.
- Rompe ampollitas de acero inoxidable.
- Jeringas desechables de 10 ml.
- Agujas desechables 25G X 16 mm.
- AMBAS PRUEBAS
- Piceta con alcohol etílico al 70%.
- Piceta con sanitizante de acuerdo al rol de sanitizantes anual.
- Plumón indeleble de uso exclusivo en áreas asépticas.
- Lienzos estériles que no liberan partículas.
- Gradilla para tubo
- Tubos
- Mechero.
- Encendedor.
- Contenedor de punzocortantes.
- -Contenedor de basura.
- Charola de acero inoxidable



Nota: Todos los materiales que así lo requiera deberán esterilizarse de acuerdo al Procedimiento de esterilización por calor húmedo PGNCM-10/1

EQUIPO

- Campana de flujo laminar Lumistell
- Equipo de filtración: Consta de un filtro de polisulfona o vidrio, un portafiltros conectado a un sistema de vacío con una velocidad de flujo de 55 a 75 ml por minuto (De acuerdo a la certificación del proveedor), bajo una presión de 70 mm de mercurio.
 - Incubadora ajustada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.
 - Incubadora ajustada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Nota: Todos los equipos deben encontrarse debidamente calificados con la documentación que lo respalde y una etiqueta visible que muestre la vigencia de dicha condición.

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

- Tubo con 100 ml de Medio líquido Tioglicolato (MLT).
- Tubo con 100 ml de Caldo Soya Trypticaseina (CST).
- Tubo con 100 ml Solución de peptona al 1%.
- Tubo con 100 ml Solución de peptona al 1% con polisorbato.
- Placas con Agar Soya Trypticaseina (AST).
- Placas con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS).

Nota: Los medios de cultivo deberán prepararse de acuerdo al Procedimiento de Preparación de medios de cultivo PGNCM-007/14. Deben cumplir con las pruebas de promoción de crecimiento y esterilidad, aplicando el Procedimiento PGNCM-117/1 y esterilidad al 3% del lote preparado estas pruebas deben realizarse después de la esterilización de los medios. Si los medios de cultivo no se usan de inmediato, se deben almacenar a una temperatura de 2°C y 25°C , verificando que los envases estén perfectamente cerrados.



VII. PROCEDIMIENTO

1. La prueba de esterilidad se puede realizar por dos métodos.

- A) Directo.
- B) Filtración por membrana.

Para cada muestra se deberá elegir el método a utilizar el cuál dependerá de la naturaleza de producto. El método de filtración en membrana se utiliza para productos acuosos, productos oleosos o con base alcohólica y productos que sean miscibles en solventes oleosos o acuosos, con el antecedente que estos solventes no poseen actividad antimicrobiana bajo las condiciones de prueba.

2. El muestreo del número de envases de material de empaque y la cantidad de cuñetes de materia prima a muestrear se realizara de acuerdo al Procedimiento Muestreo de material de empaque y materia prima POPCP-007/2 el cuál esta referenciado a las tablas militar estándar, por lo que se asegura muestrear una cantidad representativa de acuerdo al tamaño de lote. Para elegir la cantidad de muestra o el número de piezas que ingresara a la prueba de esterilidad. Se realizara de acuerdo a la siguiente tabla.

TABLA I

PRODUCTO	NÚMERO MÍNIMO DE PIEZAS PARA CADA MEDIO DE CULTIVO O VOLUMEN MÍNIMO A FILTRAR
Productos parenterales en etapa intermedia	100 ml
Productos parenterales en etapa final a granel	100 ml
Volumen de Producto Terminado 100 ampollitas de 1ml o menor De 1 ml a 40 ml	Todo el contenido La mitad del contenido pero no menos de 1 ml. Realizar un pool hasta completar un volumen final de 100 ml.
Ampolleta (Envase primario)	Enjuague de 50 piezas



Jeringa ambar (Envase primario)	5 piezas en Caldo Soya Trypticaseina y 5 piezas en Caldo Tioglicolato. Realizar cada medio por cuadruplicado
Jeringa desechable (Envase primario)	5 ampolletas en Caldo Soya Trypticaseina y 5 en Caldo Tioglicolato. Realizar cada medio por cuadruplicado
Plunger	10 piezas en Caldo Soya Trypticaseina y 10 piezas en Caldo Tioglicolato. Realizar cada medio por duplicado
Agujas	10 piezas en Caldo Soya Trypticaseina y 10 piezas en Caldo Tioglicolato. Realizar cada medio por duplicado

1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

1.1 Para cada prueba a realizar prepare lo siguiente:

- Tubo o frasco con Caldo Soya Trypticaseina.
- Tubo o frasco con Caldo Tioglicolato.
- Tubo de peptona o Tubo de peptona con polisorbato

1.2 Producto Terminado

1.2.1 El número de ampolletas será el que se indica en la tabla I.

1.2.2 Coloque las ampolletas en un vaso de precipitados de capacidad suficiente.

1.2.3 Adicione alcohol al 70% hasta que se cubran totalmente las ampolletas.

1.2.4 Deje las ampolletas en el alcohol por lo menos 30 minutos antes de realizar la prueba.

1.2.5 Identifique el vaso de precipitados con los siguientes datos:

- Nombre del producto
- Número de lote
- Fecha



1.3 Materia Prima estéril.

1.3.1 Incluya al material un tubo con 100 ml de peptona al 1% estéril, previamente identificado para la disolución de la muestra, en caso de que sea soluble en un medio acuoso.

1.3.2 Si la materia prima es soluble en un medio oleoso deberá incluir un tubo con 100 ml de peptona al 1% con polisorbato.

1.4 En caso de Material de Empaque estéril.

1.4.2 Los medios de cultivo empleados en la Prueba de Caldo Soya Trypticaseína y Medio líquido Tioglicolato deben contener un volumen de 200 ml, para que logre cubrir completamente las muestras.

1.4.3 El material de empaque debe estar contenido en doble bolsa la primera se debe eliminar antes de ingresarla a la luz UV y la segunda debe sanitizarse perfectamente e ingresarse posteriormente a la luz UV.

1.5 Identifique cada uno de los frascos con medio de cultivo con los siguientes datos:

- Nombre del medio de cultivo:

A) Medio líquido Tioglicolato (MLT).

B) Caldo Soya Trypticaseína (CST).

- Nombre del producto o testigo negativo.

- Número de lote.

- Presentación del producto.

PI – Producto Terminado.

PT – Producto Terminado a granel.

MP – Materia Prima.

ME – Material de empaque.

- Fecha de inicio de análisis.

- Fecha de fin de análisis.

- Iniciales del analista.



1.6 Dependiendo del tipo de prueba incluir el material establecido en el apartado VI.

1.7 Realice la sanitización de una charola de acero inoxidable colocando en ella el material acondicionado

1.8 Realice la sanitización de la trampa con alcohol etílico al 70% de la siguiente forma:

1.8.1 Limpie con una gasa impregnada con el sanitizante en turno de adentro hacia fuera.

1.8.2 Comience por el techo de la trampa y termine en la base de la trampa modificando el dobléz del lienzo con cada parte de la trampa.

1.8.3 Coloque la charola que contiene el material en la trampa de luz U.V. durante 20 minutos.

1.8.4 Transcurridos los 20 minutos apague la lampara.

Nota: El material se debe ordenar dentro de la trampa de luz UV de manera que quede expuesta toda la superficie de este y si no es posible cambiarlo de posición para que se exponga por completo.

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

2. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

2.1 Ingrese al vestidor del área aséptica.

2.2 Proceda al vestido con el uniforme estéril aplicando el Procedimiento PGNCM-18/2

2.3 Ingrese al área aséptica e inicie el funcionamiento de la Campana de Flujo Laminar (CFL) desde la sanitización hasta el encendido aplicando el Procedimiento PGNCM-00/3.

2.4 Sanitice la mesa que se localiza frente a la CFL y traslade el material de la lampara de luz UV.

2.5 Comience el monitoreo ambiental del área siguiendo el procedimiento PGNCM-027

2.6 Encienda el mechero.

2.7 Arme el equipo de filtración completo cómo muestra la siguiente figura.

2.8 Coloque un filtro sobre el soporte.

2.9 Deposite una membrana estéril dentro del filtro.



- 2.10 Recolecte la cantidad de muestra indicada en la tabla I según sea el caso del producto a analizar.
- 2.11 Vacíe el contenido de la muestra completamente dentro del filtro.
- 2.12 Enjuague el filtro con 100 ml de peptona al 1%
- 2.13 Corte la membrana con ayuda de una aguja por la mitad.
- 2.14 Remueva la mitad de la membrana con pinzas y transfiera una mitad en CST y la otra mitad en CT flameando la boca de los recipientes al abrir y cerrar cada uno.
 - 2.15. Realice el análisis dependiendo de la naturaleza de la muestra y del método de análisis elegido ya sea Método de filtración o método directo.
- 2.16 Coloque las yemas de sus dedos en una placa de AST y en una de ADS.
- 2.17 Apague el mechero
- 2.18 Coloque su material nuevamente en la charola de transporte.
- 2.19 Traslade el material a la trampa de luz UV.
- 2.20 Apague la campana de flujo laminar.
- 2.21 Sanitice la campana de acuerdo al Procedimiento POPCM-002/3 y la mesa de trabajo.
- 2.22 Recoja las placas expuestas para el control ambiental del área.
- 2.23 Verifique que este cerrada la llave del gas y la bomba de vacío.
- 2.24 Diríjase al vestidor y proceda a despojarse del uniforme estéril, y a vestirse nuevamente con su ropa de trabajo.
- 2.25 Incube el Caldo Soya Trypticaseína y las placas de ADS a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, las placas durante un periodo de 5 días y los medios de cultivo durante un tiempo de 14 días.
- 2.26 Incube el Medio líquido Tioglicolato y las placas de AST a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, las placas durante un periodo de 3 días y los medios de cultivo durante un tiempo de 14 días.

MÉTODO DE FILTRACIÓN



RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

2.15.1 PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

2.15.1.1 Transfiera el número total de ampolletas a un lienzo.

2.15.1.2 Saque de su envoltura un rompeampolletas estéril.

2.15.1.3 Frente al mechero abra cada ampolleta y colóquelas formando líneas diagonales que no obstruyan el flujo laminar.

2.15.1.4 Con ayuda de una jeringa desechable transfiera el contenido de las ampolletas en un frasco estéril.

2.15.2 JERINGAS PRELLENADAS

2.15.2.1 Coloque las jeringas sobre una gasa impregnada con alcohol etílico al 70%

2.15.2.2 Expulse el contenido de cada jeringa en un frasco para coleccionar la muestra.

2.15.3 PRODUCTO INTERMEDIO

2.15.3.1 La muestra es recolectada del primer filtrado dentro de un frasco estéril.

2.15.4 MATERIAS PRIMAS

2.15.4.1 Pese la cantidad requerida de materia prima indicada en la tabla I

2.15.4.2 Transfiera a 100 ml del disolvente el cual dependerá de la naturaleza de la materia prima, en caso de desconocerlo consulte el certificado del fabricante.

Nota: En caso de que la materia prima no se disuelva completamente y al agregar la membrana al medio de cultivo se enturbia, no será posible observar la contaminación microbiana a simple vista, una vez concluidos los 14 días de incubación, transfiera en condiciones asépticas 2 ml de muestra del medio que contenga la muestra a un medio nuevo del mismo tipo que el original. Continúe la incubación de todos los medios incluyendo originales y resiembra por 4 días más, la lectura se realiza a la cabeza de la resiembra.

2.15.5 AMPOLLETA

2.15.5.1 Coloque una gasa estéril a un extremo de la base del gabinete de la campana.

2.15.5.2 Saque las ampolletas del vaso y colóquelas sobre esta.

2.15.5.3 Espere un momento a que el alcohol se evapore.



2.15.5.4 Coloque una segunda gasa frente al mechero y pase la mitad de las ampolletas a esta.

Sujete un rompe ampolletas estéril y saque de su envoltura.

2.15.5.5 Frente al mechero abra las ampolletas una a una y coloque formando líneas diagonales.

2.15.5.6 Con ayuda de una jeringa estéril coloque agua estéril a cada una de las ampolleta

2.15.5.7 Enjuague el interior de la ampolleta y coloque el agua en un frasco estéril identificado.

2.15.5.8 Realice lo mismo para el resto de las ampolletas hasta completar 50 muestras.

NOTA: El volumen mínimo de enjuague para cada pieza debe ser de 1 ml.

2.15.6 TESTIGO

Filtre 100 ml del disolvente empleado en la prueba e incube bajo las mismas condiciones que las muestras y por el mismo tiempo.

3. MÉTODO DIRECTO

2.15.6 JERINGA ÁMBAR

Con ayuda de dos pinzas estériles separe cada una de las jeringas de su tapón y coloque cinco dentro de un frasco con Caldo Soya Trypticaseina, repita la prueba hasta completar 20 piezas, realice el mismo Procedimiento con Medio líquido Tioglicolato.

2.15.7 PLUNGER

Coloque con pinzas estériles 10 piezas en un frascos con 100 ml de Caldo Soya Trypticaseina realice la prueba por duplicado, aplique el mismo procedimiento con Medio líquido Tioglicolato.

2.15.8 AGUJAS

2.15.8.1 Abra el empaque individual de cada una y con ayuda de unas pinzas estériles coloque 10 agujas dentro de un frasco que contenga Caldo Soya Trypticaseina, realice la prueba por duplicado.



2.15.8.2 Inocule 2 frascos más que contenga 100 ml de Medio líquido Tioglicolato con 5 agujas cada uno.

2.15.9 JERINGAS DESECHABLES

2.15.9.1 Abra el empaque individual

2.15.9.2 Con ayuda de 2 pinzas estériles desensamble cada la jeringa por completo en cada una de las partes que la componen (jeringa, aguja, embolo, capuchón de aguja).

2.15.9.3 Coloque todas las partes dentro de un frasco con 200 ml de CST, flameando previamente la boca del recipiente, realice el mismo procedimiento hasta completar 3 jeringas.

2.15.9.4 Repita este procedimiento con Medio líquido Tioglicolato.

2.15.10 TESTIGO DE MEDIO

Incluir un testigo de cada medio utilizado por prueba, incubarlo a las mismas condiciones de análisis por el mismo tiempo que las muestras.

4. PRUEBA DE INHIBICIÓN

Esta prueba se debe realizar a cada producto teniendo especial cuidado en formulaciones nuevas. Con el objetivo de descartar cualquier tipo de inhibición del producto hacia el crecimiento microbiano.

3.1 Se realiza inoculando la muestra con no más de 100UFC de los microorganismos especificados en el Procedimiento de Promoción de Crecimiento PGNCM-015/4 y analiza la muestra como se describe anteriormente en el punto 2.7.

3.2 Al concluir la incubación compare los medios empleados con producto y los que no lo contienen si existe un crecimiento similar en ambos medios se concluye que no existe actividad antimicrobiana.

Si no se observa crecimiento en los medios en los que estuvo el producto se concluye que existe cierta actividad antimicrobiana y por tanto se deben modificar las condiciones de la prueba de esterilidad cómo incrementar el volumen de medio, aumentando el número de enjuagues o bien agregando agentes neutralizantes con el fin de eliminar la inhibición.

VIII. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



Examinar los frascos una vez concluido el tiempo de incubación e interpretar basándose en la Tabla II

TABLA II

OBSERVACIÓN	RESULTADO	PROCEDER
No existe turbidez	Cumple con la prueba de esterilidad	
Turbidez en las muestras y en los testigos	Prueba descartada	Repita la prueba con el mismo número de muestras
Turbidez en las muestras y Testigos sin turbidez	Prueba por confirmar	Hacer tinción de Gram y pruebas bioquímicas, repetir la prueba con el doble de muestras y cambio de analista. Cuidando emplear un lote de preparación diferente a la primera prueba.
Segunda prueba con turbidez o crecimiento microbiano	No cumple con la prueba de Esterilidad	Realice tinción de Gram. Si en la identificación el m.o. es igual a la primera prueba, el producto está contaminado
Segunda prueba sin turbidez o crecimiento microbianos.	Cumple con la prueba de esterilidad	

Nota: Se debe verificar que cada medio empleado cumpla con las pruebas de esterilidad y Promoción de crecimiento, y comprobar que la muestra no interfiera o este provocando una inhibición. De no contar con estos datos es imposible emitir un dictamen del producto.

IX. DOCUMENTACIÓN

9.1 Registre en la bitacora 21 Los siguientes datos:

- Nombre del Producto, Material de empaque o materia Prima.
- En caso de Producto, etapa del Proceso:
 - 1) PI –Producto Intermedio



- 2) PT – Producto Terminado
 - Lote o número de control.
 - Para materias Primas y materiales de empaque:
 - 1) Proveedor
 - 2) Lote Proveedor
 - 3) Número total de piezas
 - 4) Número de recipientes
 - Fecha de inicio de análisis.
 - Fecha de fin de análisis.
 - Resultados en Caldo Soya y Caldo Tioglicolato:
 - 1) Prueba de esterilidad
 - 2) Testigos
 - 3) Promoción de crecimiento
 - Analista

Nota: Si existió algún reanálisis incluya en la bitácora los resultados de las tinciones y Bioquímicas realizadas en cada prueba.

X. CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Los resultados obtenidos en la prueba de esterilidad son confiables y validos:

- Al concluir la incubación los medios inoculados no presentan turbidez evidencia de crecimiento microbiano.
- Los medios empleados en la Prueba cumplen Satisfactoriamente con la prueba de esterilidad y Promoción de crecimiento.
- Los resultados del monitoreo ambiental se encuentran dentro de especificaciones.

XI. REFERENCIA

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª edición 2004. Tomo I. Pags 426 – 432.

II. DISTRIBUCIÓN

1. Gerencia de Garantía de Calidad.
2. Jefatura de Control de Calidad.
3. Microbiología.



DEFINICIONES

DESINFECTANTE: Sustancia química que reduce el número de formas vegetativas de microorganismos patógenos.

ANTISÉPTICO: Agente químico que mata o inhibe a microorganismos patógenos y son seguros para su aplicación en piel y mucosas

GERMICIDA: Agente químico que mata a células vegetativas. No es necesariamente un término empleado para destruir microorganismos causantes de enfermedad.

SANITIZANTE: Agente químico que reduce la población microbiana a niveles de seguridad.

ESTERILIZANTE: Agente capaz de eliminar o destruir todo organismo presente.

ESTERILIDAD: Ausencia total de organismos vivos



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La Industria farmacéutica requiere de una gran cantidad de controles que garanticen por completo la calidad de los productos fabricados actualmente existe una gran cantidad de metodologías que diversas Asociaciones Nacionales e Internacionales sugieren para evaluar la calidad de los medicamentos durante su fabricación, cada laboratorio debe establecer cuál de estas metodologías son exactas, precisas y confiables proporcionen datos representativos de la calidad de los productos fabricados.

El uso de Procedimientos normalizados de trabajo permiten homogenizar cada una de las metodologías implementadas, facilita la capacitación y puede constituir una recopilación de conocimientos, experiencia y actualización de las personas que laboran en este sitio.



RECOMENDACIONES

Resulta fundamental dar la importancia requerida a la capacitación del personal considerando que realmente la calidad del producto se encuentra en sus manos, es por ello que los Procedimientos Normalizados de Trabajo son las herramientas fundamentales para cumplir con dicho objetivo, que si bien deben cumplir con la Normatividad actual, también deben ser adecuadas de manera práctica a los requerimientos de cada laboratorio. Deben ser redactados por expertos en el tema que realmente es la persona que lo aplica.

La fusión entre conocimientos adquiridos durante el estudio Profesional de la carrera y aplicarlos al desempeño laboral resulta una nueva puerta de conocimientos que requiere de actualización continua en donde las herramientas principales son la honestidad y la ética profesional.



CONCLUSIONES

- El presente trabajo muestra una recopilación de Procedimientos normalizados de Trabajo requeridos para evaluar microbiológicamente la calidad de los Procesos de fabricación de formas farmacéuticas parenterales.
- Se establece la importancia de la Microbiología cómo parámetro de calidad determinante de la inocuidad de medicamentos pareterales.
- Se establece la importancia de los Procedimientos Normalizados de trabajo cómo una descripción clara de cada una de las metodologías cómo una recopilación de la experiencia de los individuos que desempeñan el trabajo y la capacitación asociada a la actividad que permiten obtener un trabajo confiable y consistente.



BIBLIOGRAFÍA

1. Emilio Moia. El criterio de diseño de un área limpia farmacéutica. Tecnología Industrial. Marzo 2000.
2. Federal and Drug Administration. Enviromental monitoring Regulador Sigues.
3. Rusell E Madsen .Minimización del riesgo a través de la tecnología. Pharmaceutical Technology. Volumen 3 Agosto 2005.
4. Manuel A del Valle. Mantenimiento Biopharmaceutical cleanrooms obediente. . Internacional BioPharma 2002.
5. Natalia Aguilera y col. El dilema de los estériles. Diciembre 1999. Universidad ICESI
7. Federal Estandar 209E. Airbone particles cleanliness classes in cleanrooms and clean zones.
8. Ministerio de Salud Pública Buenas prácticas para la fabricación de productos estériles. Directrices sobre buenas prácticas para la fabricación de productos farmacéuticos. Republica de Cuba. Centro para el control estatal de los medicamentos. Regulación No 16-2000.
9. Norma Oficial 059. Secretaria de Salud. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutico dedicados a la fabricación de medicamentos.
10. Curso Microbiología para no microbiólogos 2004.
11. Henry D. Isenberg. Manual de Procedimientos en Microbiología clínica.
12. James Agalloco. Proceso aséptico. Una visión del futuro. Agosto 2005.
13. Yves Cohan. Análisis Químico Farmacéutico. Noriega Editores. Página 858-862.
14. Ensayos de endotoxinas bacterianas.<http://www.infoleg.gov.ar/txtnorma/dto202-2003-40.htm>.
15. Revista Cubana de Farmacia Volumen 38 No1. Ciudad de la Habana Enero 2004. Ensayo del lisado de amebocitos de Limulus.
16. Alasbimn Journal. Year4, Number 16. July 2002. Vali... on de l... r... A... Clot)en los agentes de Radiodiagnóstico.
17. M. R. Breach Esterilización. Métodos de control. Editorial el manual Moderno. México DF 1976.
18. NOM 059



19. U.S. Departamento f Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry sterile drug products produced by Aseptic Processing. September 2004

20. Comisión interinstitucional de practicas adecuadas de manufactura. CIPAM. Guía para el control microbiológico de medicamentos. Monografía técnica No 4. México 1992

21. Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos. Octava edición 2004.

