



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Monitoreo ambiental del área aséptica de  
la planta piloto farmacéutica de la FES  
Zaragoza UNAM**

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

GONZÁLEZ MARTÍNEZ RICARDO

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. MARÍA CIRENIA SANDOVAL LÓPEZ

ASESOR DE TESIS: MAESTRA DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F., MARZO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*La vida no es fácil para nadie.  
¿Y qué importa?  
Debemos tener perseverancia  
Y confianza en nosotros mismos;  
Creer que tenemos un don para algo  
Y que ese algo debe ser realizado.*

*Marie Curie*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
<b>2.1 Área aséptica</b> .....	4
2.1.1 Purificación del aire.....	5
2.1.2 Mantenimiento del área aséptica .....	5
<b>2.2 Personal</b> .....	6
<b>2.3 Evaluación del control ambiental</b> .....	6
<b>2.4 Norma ISO 14644</b> .....	8
<b>2.5 Norma ISO 14698</b> .....	8
<b>2.6 Identificación de microorganismos</b> .....	11
2.6.1 Características morfológicas de las bacterias .....	12
2.6.2 Características coloniales de las bacterias .....	12
2.6.3 Morfología microscópica y características tintoriales.....	13
2.6.4 Tinción de Gram.....	13
2.6.5 Pruebas bioquímicas.....	14
2.6.6 Hongos.....	21
<b>3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	24
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	25
<b>5 HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>6 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	27
<b>6.1 Materiales</b> .....	27
6.1.1 Limpieza y sanitización del área aséptica .....	27
6.1.2 Monitoreo del área aséptica.....	27
6.1.3 Filtración aséptica.....	27
6.1.4 Preparación de medios de cultivo y caracterización de microorganismos .....	27
<b>6.2 REACTIVOS</b> .....	28
<b>6.3 EQUIPOS</b> .....	29
<b>6.4 MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	29
<b>6.6 PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS</b> ....	30

6.6.1	Limpieza del área aséptica.....	30
6.6.2	Monitoreo ambiental del área aséptica.....	32
6.6.3	Utilización del tanque de filtración por membrana.....	34
6.6.4	Identificación microbiológica.....	36
7	RESULTADOS.....	41
7	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	64
8	CONCLUSIONES.....	69
9	PROPUESTAS.....	70
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
11	APÉNDICE A.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	NOMBRE	PÁGINA
<b>1</b>	Selección de las clases de limpieza de partículas aerotransportadas para cuartos y zonas limpias	<b>9</b>
<b>2</b>	Áreas de fabricación farmacéutica	<b>10</b>
<b>3</b>	Número y tamaño de partículas totales presentes en las diferentes secciones que integran el área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM antes de que el motor de la Unidad Manejadora de Aire fuera reemplazado	<b>42</b>
<b>4</b>	Número y tamaño de partículas totales presentes en las diferentes secciones que integran el área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM después de que el motor de la Unidad Manejadora de Aire fuera reemplazado	<b>43</b>
<b>5</b>	Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica antes del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>44</b>
<b>6</b>	Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica antes del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>44</b>
<b>7</b>	Unidades formadoras de colonias de hongos obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica antes del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>45</b>
<b>8</b>	Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica después del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>45</b>
<b>9</b>	Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica después del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>46</b>
<b>10</b>	Unidades formadoras de colonias de hongos obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica después del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>46</b>
<b>11</b>	Cantidad de muestras en las que se presentó crecimiento de microorganismos antes y después del reemplazo del motor de la Unidad Manejadora de Aire	<b>47</b>
<b>12</b>	Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>47</b>

<b>13</b>	Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>48</b>
<b>14</b>	Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>48</b>
<b>15</b>	Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>49</b>
<b>16</b>	Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>49</b>
<b>17</b>	Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>50</b>
<b>18</b>	Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>50</b>
<b>19</b>	Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>51</b>
<b>20</b>	Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>51</b>
<b>21</b>	Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM	<b>52</b>
<b>22</b>	Caracterización e identificación de los hongos presentes en el área aséptica de la planta piloto farmacéutica antes del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>53</b>
<b>23</b>	Caracterización e identificación de los hongos presentes en el área aséptica de la planta piloto farmacéutica después del cambio de la Unidad Manejadora de Aire	<b>54</b>
<b>24</b>	Género y cantidad de hongos aislados del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>54</b>
<b>25</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>55</b>
<b>26</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>56</b>

<b>27</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>57</b>
<b>28</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>58</b>
<b>29</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>59</b>
<b>30</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>60</b>
<b>31</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>61</b>
<b>32</b>	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>62</b>
<b>33</b>	Género y porcentaje de bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>63</b>

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

<b>DIAGRAMA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Diagrama del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>30</b>
<b>2</b>	Metodología realizada para el monitoreo ambiental del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM	<b>32</b>

## RESUMEN

Del mes de Enero a Junio del año 2013 se realizó el monitoreo ambiental y microbiológico de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM, con el fin de identificar los tipos de microorganismos presentes. El muestreo se realizó en las 7 secciones que conforman el área aséptica (Vestido 1, Vestido 2, Pasillo, Filtración, Llenado 1, Llenado 2 y Recepción de material). Para el caso de las partículas totales, estas se muestrearon con el contador de partículas Lighthouse Worldwide Solution propio de la planta, mientras que el muestreo de partículas viables superficiales se llevó a cabo por técnica de hisopo, antes y después de que la Unidad Manejadora de Aire (UMA) fuera reemplazada.

En todos los espacios muestreados se obtuvo gran crecimiento de microorganismos, sobrepasando los límites permitidos por la norma oficial mexicana NOM-059-SSA1-2013 para un área aséptica. Se encontraron más muestras con bacterias (61.90 % y 66.67 % antes y después del cambio de motor respectivamente) que con hongos (19.04 % y 14.29 % antes y después del cambio de motor respectivamente), predominando los bacilos Gram positivos y los hongos filamentosos.

Los géneros bacterianos Gram positivos más frecuentes fueron: *Bacillus* (37.14 %) y *Micrococcus* (5.71 %), mientras que las bacterias Gram negativas más frecuentes fueron: *Moraxella* (22.86 %), *Pseudomonas* (17.14 %). Para el caso de los hongos el género *Penicillium* (71.43 %) fue el que se encontró en mayor proporción. Cabe mencionar que solo se aislaron hongos filamentosos y ningún hongo levaduriforme.

En el desarrollo del proyecto se identificaron a las bacterias y hongos presentes en el área aséptica, generando así información necesaria para conocer las condiciones actuales del área y sobre todo poder implementar un rol de sanitizantes específico que ayude, junto con el mantenimiento adecuado del área aséptica a proveer las condiciones adecuadas de funcionalidad, manteniendo el contenido de partículas viables y no viables dentro de los límites permitidos para áreas tan controladas como lo es el área aséptica.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las décadas recientes, los procesos asépticos que se llevan a cabo en áreas asépticas han presentado un incremento sustancial en cuanto a sus aplicaciones en diversas industrias como la farmacéutica y la microelectrónica.

En la industria farmacéutica, la fabricación de productos estériles es quizá uno de los procesos más controlados y críticos que se lleven a cabo. Está sujeta a requisitos especiales para minimizar los riesgos de contaminación microbiana, de partículas y de pirógenos.

Dentro de los requisitos para llevar a cabo un proceso aséptico está contar con un área que cumpla con los criterios de diseño y acabado sanitario para facilitar su limpieza y sanitización, como superficies lisas y no porosas, incluyendo paredes y techos rasos que puedan ser sanitizados periódicamente, cuartos de vestuario con espacio suficiente para el personal y almacenamiento de vestimenta estéril; separación adecuada entre las áreas donde el personal se prepara para el ingreso al área y las áreas de procesamiento aséptico final, presiones positiva en los cuartos de fabricación con relación a los pasillos que conforman el área aséptica y controles apropiados de humedad y temperatura. <sup>(1)</sup>

La calidad del aire del área aséptica es otro factor determinante para la salud humana y la calidad de los productos. Es por ello que se ha hecho necesaria la implementación de sistemas de aire para prevenir la contaminación proveniente de partículas viables y no viables suspendidas en el aire. El surgimiento de filtros de aire HEPA (High Efficiency Particulate Air) con una gran eficiencia en la limpieza del aire (99.97% en la retención de partículas de 0.3  $\mu\text{m}$ ) facilitó los procesos de control de la contaminación proveniente del aire. Con el uso de este dispositivo es posible reducir la contaminación a un nivel donde el aire no es ya un factor crítico en la causa de la contaminación. <sup>(1)</sup>

Como el uso de filtros de aire se volvió más popular, se desarrollaron nuevas técnicas de tratamiento de aire con filtros HEPA. Uno de estos casos fue el uso de un sistema de flujo laminar de aire, el cual se introdujo en el proceso de fabricación de fármacos parenterales a principios de la década de 1960. Este sistema de flujo laminar proporciona una masa continua de aire limpio para el producto, y como presenta un movimiento continuo en la misma dirección desplaza a cualquier contaminante originado durante el proceso de manufactura, eliminándolos así del entorno crítico. <sup>(1)</sup>

El personal que labora en áreas asépticas es otra de las potenciales fuentes de contaminación, por ello debe de adoptar posturas de limpieza, compromiso y orden. Todo el personal que ingresa a estas áreas debe encontrarse bajo un programa integral de capacitación y adiestramiento continuo, de acuerdo al procedimiento correspondiente, el cual debe incluir al menos conceptos básicos de microbiología, técnicas de vestido, reglas de higiene y otros temas específicos aplicables a productos estériles, ya que de ellos depende la confiabilidad y calidad del producto final.

Por todo esto a nivel internacional se han planteado normas que homogenicen los métodos de prevención y control de la contaminación en áreas asépticas, tal es el caso de las Normas ISO 14644 e ISO 14698 que describen los principios y la metodología básica de un sistema formal para evaluar y controlar la contaminación de carácter biológico en áreas asépticas a fin de que la contaminación en zonas de riesgo pueden ser controlados de una manera reproducible y se implementen medidas de control adecuadas.

En México la norma que tiene como objetivo sentar las pautas para el control de la producción de formas farmacéuticas estériles es la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.

La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM cuenta en sus instalaciones con una planta piloto farmacéutica, la cual presenta en su diseño un área aséptica claramente delimitada del resto de las áreas de producción. Es aquí donde los estudiantes de la carrera de Química Farmacéutico Biológica adquieren los conocimientos y habilidades necesarias para poder desarrollar procesos de producción en condiciones asépticas que generen productos confiables y de calidad. Para ello es necesario asegurar que el ambiente y las condiciones en que se trabaja cumplan con las especificaciones de esterilidad indicadas por la NOM-059-SSA1-2013 o incluso por las Normas internacionales ISO de gestión ambiental como la Norma ISO 14644 y la Norma ISO 14698.

Diversas investigaciones han demostrado que el área aséptica de la planta piloto farmacéutica presenta una carga tanto de partículas viables como no viables mayor a la permitida para áreas asépticas. Es por ello que es necesario evaluar la calidad del aire (una de las principales fuentes de contaminación) y caracterizar e identificar de manera precisa a los microorganismos (bacterias y hongos) presentes. Esto servirá para comprobar la confiabilidad del área e identificar aquellos eventos que pueden ser la causa de no conformidades; permitiendo así la optimización del área y los procesos que ahí se realizan. <sup>(2, 3)</sup>

## 2. MARCO TEÓRICO

El área de producción de una planta farmacéutica se divide en cinco sectores funcionales: el área de limpieza, el área de mezclado, el área aséptica, el área de cuarentena y el área de acabado o envasado. Todas estas áreas deben ser diseñadas y construidas para que su limpieza sea fácil y para que tengan correcto control ambiental, operatorio eficiente y comodidad para el personal. Los requerimientos adicionales para el área aséptica están destinados a proveer un medio donde, por ejemplo, un inyectable pueda ser expuesto al ambiente durante un breve periodo sin contaminarse, durante el fraccionamiento de un envase a granel, los contaminantes tales como polvo, pelusa y microorganismos se encuentran normalmente flotando en el aire, posados en mostradores y otras superficies, en las ropas y la superficie corporal del personal, en el aire exhalado por el personal y depositados en el suelo. El diseño y el control de un área aséptica apuntan a reducir la presencia de contaminantes, para que ya no sean un riesgo en perjuicio del llenado aséptico. Aunque el área aséptica debe estar del lado de las áreas de apoyo, de modo que pueda lograrse un flujo eficaz de componentes, también deben existir barreras que minimicen el riesgo de contaminantes al área aséptica crítica. <sup>(1)</sup>

Estas barreras pueden ser de varios tipos, entre ellas; paredes selladas, puertas manuales, o automáticas, pasajes con cámaras de aire a presión, accesos de diversos tipos o cortinas plásticas de inyección de aire. <sup>(1)</sup>

### 2.1 Área aséptica

El área aséptica requiere características de construcción diseñadas para el máximo control de microorganismos y partículas. El cielo raso, las paredes y el piso deben estar sellados, de modo que puedan ser lavados e higienizados de manera efectiva. Todos los artefactos luminosos, las líneas de servicios y las instalaciones de ventilación deben estar embutidos en las paredes o el cielo raso para eliminar bordes, uniones y otros sitios que pudieran acumular polvo y suciedad. En lo posible, los tanques que contengan el producto mezclado deben quedar fuera del área de llenado aséptico y el producto debe ser introducido a ésta a través de tubos. <sup>(1)</sup>

Los miembros del personal que ingresan al área aséptica sólo deben hacerlo a través de una cámara de aire a presión. Es preciso que estén vestidos con un uniforme propio del área; consistente en gorro, máscara, gafas y cubrepiés (botas) estériles. Dentro de la sala los movimientos deben ser mínimos y durante el procedimiento de llenado la entrada y la salida quedan rígidamente restringidas. <sup>(1)</sup>

### **2.1.1 Purificación del aire**

En estas áreas el aire puede ser una de las principales fuentes de contaminación. Sin embargo, esto no debe ocurrir dado que existen varios métodos disponibles para proveer aire esencialmente libre de partículas de suciedad y de microorganismos. <sup>(1)</sup>

Para proveer un aire así hay que liberarlo por completo de todos los contaminantes. Esto se puede lograr mediante una serie de tratamientos que pueden variar de una instalación a otra. Uno de esos tratamientos consiste en que el aire del exterior pase primero por un prefiltro, usualmente de lana de vidrio, tela o plástico desmenuzado, para eliminar las partículas grandes. Luego se lo trata pasándolo a través de un precipitador electrostático. El aire pasa después por el dispositivo de limpieza más eficiente, un filtro HEPA con un mínimo del 99.97% de eficiencia en la remoción de partículas de 0.3  $\mu\text{m}$  o más grandes, de acuerdo con la prueba DOF (dioctil ftalato). <sup>(1)</sup>

Para la comodidad del personal, el sistema debe tener incorporado aire acondicionado y humedad controlada. <sup>(1)</sup>

Ambientes con flujo laminar. El control ambiental requerido por las áreas asépticas ha sido posible por el uso de “cercos” de flujo laminar de aire. El flujo laminar de aire provee un barrido constante del espacio confinado porque toda la masa de aire se mueve con una velocidad uniforme, habitualmente 35m/min  $\pm$  20% a lo largo de líneas paralelas a partir de un filtro HEPA que ocupa todo un costado del espacio confinado. Por consiguiente, baña todo el espacio con aire muy limpio y arrastra los contaminantes. <sup>(1)</sup>

### **2.1.2 Mantenimiento del área aséptica**

Como la limpieza y el mantenimiento son aspectos importantes para el control de la contaminación ambiental del área aséptica deben estar a cargo de operarios instruidos especialmente y bajo la supervisión de personal entrenado en el cuidado de estas áreas. Por lo general la limpieza y el mantenimiento deben realizarse una vez concluida la jornada de trabajo, dejando un intervalo de inactividad antes de comenzar otra operación aséptica. Con el advenimiento del flujo laminar de aire filtrado con HEPA los rigores de la limpieza se han reducido pues el flujo de aire limpio “barre” continuamente el área y la conserva limpia. <sup>(1)</sup>

El sistema de aire debe controlarse de tal manera que cumpla con los parámetros de su diseño (velocidad, presión diferencial, partículas viables, partículas no viables, humedad relativa, temperatura, perfil de flujo de aire, cambios de aire), contando con indicadores y alarmas para detectar oportunamente fallas en dicho

sistema, para tomar las medidas necesarias, de acuerdo al procedimiento correspondiente. <sup>(4)</sup>

Los equipos, las áreas y los sistemas críticos utilizados deben contar con un programa de mantenimiento preventivo. <sup>(4)</sup>

## **2.2 Personal**

En las áreas asépticas clasificadas como ISO-clase 5 e ISO-clase 6 (Tabla 2), debe estar presente el mínimo de personas necesarias, que deben de seguir las técnicas asépticas aplicables de acuerdo al procedimiento correspondiente. En la medida de lo posible, deben inspeccionarse y controlarse desde el exterior. <sup>(4)</sup>

El personal seleccionado para trabajar en la preparación de un producto parenteral debe ser pulcro, ordenado y confiable. Las personas que componen este personal tienen que ser sanas y estar libres de afecciones dermatológicas que pudieran aumentar la carga microbiana. <sup>(4)</sup>

Todo el personal que ingresa a estas áreas debe encontrarse bajo un programa integral de capacitación y adiestramiento continuo, de acuerdo al procedimiento correspondiente, el cual debe incluir al menos conceptos básicos de Microbiología, técnicas de vestido, reglas de higiene y otros temas específicos aplicables a productos estériles. <sup>(4)</sup>

Para mejorar el mantenimiento del nivel de conocimiento requerido se programa el reentrenamiento a intervalos regulares. Hay que hacer esfuerzos para que los trabajadores tomen conciencia del papel vital que desempeñan en la determinación de la confiabilidad y la seguridad del producto final. <sup>(4)</sup>

## **2.3 Evaluación del control ambiental**

Los fabricantes de productos estériles usan muchos recursos para controlar el ambiente con el fin de que estos productos críticos puedan ser preparados sin contaminación. No obstante, deben efectuarse pruebas para determinar el nivel de control realmente alcanzado. Por lo común las pruebas consisten en el recuento de partículas viables y no viables suspendidas en el aire o posadas sobre las superficies existentes en el lugar de trabajo. <sup>(5)</sup>

Por lo general las pruebas usadas miden las partículas en un volumen de aire muestreado o bien las partículas que se posan o están presentes en las superficies. Un contador de partículas electrónico detectará todas las partículas de

un determinado volumen de aire al instante, pero no diferenciará entre las viables y las no viables. Sin embargo, debido a la necesidad de controlar el nivel de microorganismos en el ambiente en el que se procesan los productos estériles que por lo común se encuentran en menor cantidad que las no viables y sólo son detectables como unidades formadoras de colonias (UFC) después de un periodo de incubación adecuado. <sup>(5)</sup>

Se debe establecer un programa de monitoreo ambiental de acuerdo a un procedimiento correspondiente.

Debe existir un procedimiento que establezca tiempos límites:

- entre la esterilización y la utilización de los materiales.
- entre la preparación y el llenado del producto.
- entre el llenado y la esterilización del producto (para productos de esterilización terminal).
- de almacenamiento del agua para producción de productos estériles.
- entre el inicio y término del proceso de llenado.
- de permanencia del personal que realiza el llenado aséptico. <sup>(4)</sup>

El proceso aséptico debe incluir:

- Pisos, paredes, y techos de superficies lisas, duras que son fáciles de limpiar
- Controles de temperatura y humedad.
- Suministro de aire filtrado a través de filtros de alta eficiencia, bajo presión positiva, sin tener en cuenta si el flujo es laminar o no laminar.
- Un sistema para monitoreo de las condiciones ambientales.
- Un sistema para limpiar y desinfectar el cuarto y equipo para producir las condiciones asépticas.
- Sistemas para mantener cualquier equipo controlando las condiciones asépticas. <sup>(5)</sup>

## **2.4 Norma ISO 14644**

### Ámbito de aplicación

La ISO 14644 cubre la clasificación de la limpieza del aire en salas limpias y ambientes controlados asociados exclusivamente en términos de concentración de partículas en el aire. <sup>(6)</sup>

Sólo las poblaciones de partículas que tienen distribuciones acumulativas base el umbral (límite inferior) tamaños que van desde 0,1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  son tomadas en cuenta para efectos de clasificación (Tabla 1). <sup>(6)</sup>

Salas blancas: habitación en la que se controla la concentración de partículas en el aire, que se construye y se utiliza de una manera que se minimice la introducción, la generación y la retención de partículas dentro de la habitación, y en el que otros parámetros pertinentes, por ejemplo la temperatura, la humedad y la presión, se controlan necesariamente. <sup>(6)</sup>

## **2.5 Norma ISO 14698**

Las Norma ISO 14698 cuenta con dos Normas Internacionales de control de la Biocontaminación:

- ISO 14698-1, Salas limpias y ambientes controlados asociados. Control de la Biocontaminación. Parte 1: Principios generales y métodos.
- ISO 14698-2, Salas limpias y ambientes controlados asociados. Control de la Biocontaminación. Parte 2: Evaluación e interpretación de los datos de Biocontaminación. <sup>(7)</sup>

La norma ISO 14698-1 describe los principios y la metodología básica de un sistema formal para evaluar y controlar la biocontaminación en áreas asépticas aplicando la tecnología, a fin de que la biocontaminación en zonas de riesgo pueda ser controlada de una manera reproducible; implementando medidas de control adecuadas. En las zonas de bajo riesgo o insignificante este estándar puede ser utilizado como una fuente de información. <sup>(7)</sup>

La norma ISO 14698-2 proporciona orientación sobre los principios básicos y los requisitos metodológicos para evaluar todos los datos microbiológicos, y la estimación de biocontaminación obtenida en el muestreo de partículas viables en zonas de riesgo, según lo especificado por el sistema seleccionado. Esto no está destinado para la prueba del rendimiento microbiológico de técnicas de conteo de la determinación de unidades viables. <sup>(7)</sup>

TABLA 1. Selección de las clases de limpieza de partículas aerotransportadas para cuartos y zonas limpias

ISO número de clasificación	Límites máximos de concentración (partículas / m <sup>3</sup> de aire) para partículas iguales y más grandes que los tamaños considerados se muestra a continuación					
	0.1 μm	0.2 μm	0.3 μm	0.5 μm	1 μm	5 μm
ISO clase 1	10	2				
ISO clase 2	100	24	10	4		
ISO clase 3	1000	237	102	35	8	
ISO clase 4	10000	2370	1020	352	83	
ISO clase 5	100000	23700	10200	3520	832	29
ISO clase 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
ISO clase 7				352000	83200	2930
ISO clase 8				3520000	832000	29300
ISO clase 9				35200000	8320000	293000
NOTA	Las incertidumbres relacionadas con el proceso de medición requieren que los datos de concentración con no más de tres cifras significativas se utilizará para determinar el nivel de clasificación					

Fuente: International Standard Organization ISO 14644. Cleanrooms and associated controlled environments.

De acuerdo a lo establecido por la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, la producción de formas farmacéuticas estériles debe realizarse en las áreas controladas (Tabla 2), a las que el personal, el producto y los materiales ingresen o salgan cumpliendo con los requisitos establecidos en el procedimiento correspondiente. <sup>(4)</sup>

TABLA 2. ÁREAS DE FABRICACIÓN FARMACÉUTICA

Clasificación	Ejemplos de procesos <sup>a</sup>	Número máximo permitido de partículas totales/m <sup>3</sup> :			Partículas viables		Presión diferencial y flujo de aire	Cambios de aire (mínimos) por hora	Temperatura y humedad	Vestimenta
		Condiciones estáticas/dinámicas		Frecuencia de monitoreo	(UFC)	Frecuencia de monitoreo				
		0.5 $\mu$ m	5 $\mu$ m							
ISO-Clase 5	Llenado aséptico. Operaciones asépticas. Muestreo, pesado y surtido de insumos estériles.	3 520 / 3 520	29 / 29	CONTINUO/ Durante todo el proceso de llenado	$\leq 1/m^3$ y $\leq 1/placa^b$ y $\leq 1/huella^c$	CONTINUO/ Durante todo el proceso de llenado	$\geq 15$ Pa con respecto a cuartos adyacentes, aplicando un concepto de cascada <sup>d</sup>	n.a.	18°C a 25°C 65% HR <sup>g</sup>	Overol, escafandra, goggles cubrezapatos y guantes, estériles para área aséptica.
ISO-Clase 6	Entorno de ISO-Clase 5 para productos que no llevan esterilización terminal. Esclusas a cuartos de llenado. Cuartos vestidores para áreas ISO-Clase 5.	35 200 / 3 520 000	293 / 293	c/ 3 meses <sup>e</sup>	$\leq 10/m^3$ y $\leq 5/placa^b$ y $\leq 5/huella^c$	Diaria/Turno de producción	$\geq 15$ Pa con respecto a áreas no asépticas, aplicando un concepto de cascada	20 a 50	18°C a 25°C 30 a 65% HR	Igual que en ISO-Clase 5
ISO-Clase 7	Llenado de productos con esterilización terminal. Preparación de soluciones para filtración esterilizante, para esterilización terminal y elementos del sistema de contenedor-cierre <sup>f</sup> . Entorno de ISO-Clase 5 para productos que llevan esterilización terminal. Almacenamiento de accesorios para formas farmacéuticas estériles.	352 000 / 3 520 000	2 930 / 29 300	c/ 6 meses a excepción de llenado de soluciones con esterilización terminal que se realice c/3 meses <sup>e</sup>	$\leq 100/m^3$ y $\leq 50/placa^b$	Semanalmente	>10 Pa	20 a 50	18°C a 25°C 30 a 65% HR	Uniforme de planta limpio; cabello, vello facial y corporal cubierto, cubrebocas y guantes
ISO-Clase 8	Entorno de ISO-Clase 7. Cuartos aisladores. Cuartos incubadores y de refrigeración (localizadas en áreas de producción). Preparación y envasado primario de formas farmacéuticas no estériles. Muestreo, pesado y surtido de insumos no estériles.	3 520 000 / n.a.	29 300 / n.a.	c/ 6 meses	$\leq 200/m^3$ y $\leq 100/placa^b$	Mensualmente	>5 Pa Presión negativa donde se generan polvos con respecto a los cuartos adyacentes y positiva con respecto a donde no se generan polvos	10 a 20	18°C a 25°C 30 a 65% HR	Uniforme de planta limpio; cabello, vello facial y corporal cubierto, cubrebocas y guantes
ISO-Clase 9	Acondicionamiento secundario.	35 200 000 / n.a.	29300 0 / n.a.	Anualmente	n.a.	Anualmente	Presión positiva con respecto a áreas no clasificadas.	n.a.	18°C a 25°C	Uniforme de planta limpio; cabello cubierto.

- a** Los ejemplos aquí señalados son enunciativos más no limitativos.  
**b** Placa de sedimentación de 90 mm de diámetro, con exposición no menor a 30 minutos y no mayor a 4 horas o al tiempo validado; durante todo el tiempo que dure la operación.  
**c** Muestreo microbiológico de 5 dedos de los guantes.  
**d** La zona de flujo laminar debe cumplir con parámetro de velocidad de flujo 0.45 m/s  $\pm$  20%.  
**e** Puede realizarse con mayor frecuencia de acuerdo al mantenimiento del estado validado.  
**f** Podrá ser realizado al menos en ISO-Clase 8 siempre y cuando se soporten con estudios de validación.  
**g** Los cuartos clasificación ISO-Clase 5 deben cumplir con estos parámetros, no aplica para módulos de flujo laminar.

Fuente: Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Apéndice normativo A.

## 2.6 Identificación de microorganismos

Un esquema de clasificación proporciona una lista de características y un método de comparación para ayudar a la identificación de un organismo. Una vez identificado el organismo puede ubicarse en un esquema de clasificación concebido con anterioridad. Los microorganismos se identifican con fines prácticos, por ejemplo, para determinar un tratamiento adecuado para una infección. No siempre se les identifica con las mismas técnicas con las que se los clasifica. Casi todos los procedimientos de identificación se realizan con facilidad en un laboratorio y utilizan la menor cantidad posible de procedimientos o pruebas. Por lo general los protozoos, los gusanos y los hongos pueden identificarse por microscopía. La mayor parte de los organismos procariontes no poseen características morfológicas distintivas ni siquiera una gran variación en el tamaño y la forma. En consecuencia, los microbiólogos desarrollaron varios métodos para evaluar las reacciones metabólicas y otras características para identificar a los procariontes. <sup>(8)</sup>

En la identificación de una bacteria se realiza su asignación en un taxón según la clasificación, que consiste en el establecimiento de características fenotípicas o genotípicas. <sup>(9)</sup>

Para poder realizar la clasificación de una bacteria se realiza un esquema de trabajo que consiste principalmente en las siguientes características:

1. Obtención de cultivos puros.
2. Observación microscópica de las células mediante tinte por Gram. Lo que permite su agrupación como microorganismos Gram positivos o Gram negativos.
3. Determinación de características nutricionales.
4. Se realizan pruebas primarias que permiten determinar el género al que pertenece el aislamiento. Entre las pruebas primarias se encuentran catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa. Crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis.
5. Se realizan también pruebas secundarias o terciarias para la caracterización de la especie. Como producción de indol, producción de coagulasa, actividad de fenilalanina deaminasa, etc. <sup>(9)</sup>

### **2.6.1 Características morfológicas de las bacterias**

Durante 200 años las características morfológicas han ayudado a los taxonomistas a clasificar los organismos. Los organismos superiores con frecuencia se clasifican de acuerdo con los detalles anatómicos observados pero muchos microorganismos son demasiado semejantes para ser clasificados según sus estructuras. <sup>(8)</sup>

La evaluación inicial de la morfología de la colonia en las placas de cultivo primario tiene extrema importancia. Los laboratoristas pueden proporcionar a los médicos información preliminar con respecto a los resultados del cultivo del paciente. Esta información también es importante para decidir qué medidas se adoptarán para lograr la identificación y la caracterización definitivas del microorganismo. <sup>(10)</sup>

### **2.6.2 Características coloniales de las bacterias**

Para toda identificación bacteriana es importante destacar las características clave de una colonia bacteriana; el éxito o el fracaso de los procedimientos posteriores de identificación a menudo dependen de la precisión de estas observaciones. Los criterios utilizados con frecuencia para caracterizar el crecimiento bacteriano son:

- Tamaño de la colonia (por lo común calculada en milímetros o descrito en términos relativos como cabeza de alfiler, pequeño, medio, grande)
- Pigmentación de la colonia
- Forma de la colonia (incluye forma, elevación y bordes de la colonia)
- Aspecto de la superficie de la colonia (p. ej., brillante, opaca, mate, transparente)
- Cambios en los medios con agar como resultado del crecimiento bacteriano (p. ej., patrón hemolítico en agar sangre, cambios en el color de los indicadores de pH, corrosión de la superficie del agar, etc.)
- Olor (ciertas bacterias producen olores característicos que pueden ayudar a la identificación preliminar) <sup>(10)</sup>

Muchos de estos criterios son algo subjetivos y los términos calificativos y descriptivos utilizados pueden variar entre diferentes laboratorios. <sup>(10)</sup>

Aunque es importante la determinación cuidadosa del aspecto de la colonia, es imprudente confiar totalmente en la morfología de la colonia para su identificación preliminar. Las colonias de una especie bacteriana a menudo presentan características casi indistinguibles de las de muchas otras especies. Además, las bacterias de la misma especie exhiben diversidad morfológica. <sup>(10)</sup>

### **2.6.3 Morfología microscópica y características tintoriales**

La evaluación microscópica de la morfología celular bacteriana facilitada por la tinción de Gram u otros métodos proporcionan la información más básica e importante empleada para las estrategias de identificación definitiva. Por esta razón una tinción de Gram del crecimiento bacteriano a partir de colonias aisladas en diversos medios suele ser el primer paso en todo esquema de identificación. De acuerdo con estos hallazgos la mayoría de las bacterias de importancia clínica pueden dividirse en cuatro grupos definidos: cocos grampositivos, cocos gramnegativos, bacilos grampositivos y bacilos gramnegativos. Algunas especies bacterianas son indistinguibles desde el punto de vista morfológico y se describen como “cocobacilos gramnegativos”, “bacilos gramvariables” o pleomorfos. <sup>(10)</sup>

### **2.6.4 Tinción de Gram**

Esta tinción desarrollada por el doctor Christian Gram en 1884, es hoy la más utilizada en los laboratorios de bacteriología y permite, de acuerdo con la estructura y grosor de la pared bacteriana, agrupar las bacterias en Gram positivas y en Gram negativas. Las Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglucanos y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglucanos y poseen una membrana externa. <sup>(11)</sup>

Algunas bacterias se clasifican como Gram variables, pues simultáneamente presentan tinción de Gram positiva y de Gram negativa, aun bajo condiciones óptimas de cultivo. Sin embargo, en su estructura poseen una pared de Gram positiva, aunque la capa de peptidoglucanos es más delgada que la mayoría de las bacterias Gram positivas. <sup>(11)</sup>

Existen variaciones de esta técnica (ver Apéndice A), pero en términos generales, la tinción de Gram involucra los siguientes pasos:

1. Tinción inicial. Las células se tiñen con cristal violeta, el cual es el colorante primario. En este paso todas las células se tiñen de morado.
2. Mordente. Se adiciona yoduro (lugol) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. En este punto todas las células continúan de color morado.
3. Decoloración. Se adiciona un solvente no polar, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continúan moradas mientras que las Gram negativas quedan incoloras. Este es el paso crítico de la tinción,

pues si se exagera, se decoloran las bacterias Gram positivas y si se hace muy débil no se logrará decolorar a las bacterias Gram negativas.

4. Contratinción. Se vuelve a teñir con safranina o fucsina, de manera que las bacterias Gram negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de rosado a fucsia según el colorante empleado; en tanto, las bacterias Gram positivas no se afectan con la contratinción y permanecen moradas debido a lo intenso de esta coloración. <sup>(11)</sup>

Además de una excesiva decoloración, otro factor que puede influir en que las bacterias Gram positivas se observen parcial o completamente rosadas, es la edad del cultivo; las células viejas tienden a perder su capacidad de retener el complejo cristal violeta-yoduro. Otro factor de variabilidad podría ser condiciones de estrés durante el cultivo, que genera formas Gram negativas no viables, dentro de un cultivo de células Gram positivas. <sup>(11)</sup>

### **2.6.5 Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas consisten en distintas pruebas químicas aplicadas a muestras biológicas, las cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo que la bacteria al crecer incorpora o no. <sup>(8)</sup>

En general el microorganismo se cultiva en medios que contienen una sustancia nutritiva específica o sustrato y después de la incubación del cultivo se examina para ver los cambios químicos que hayan ocurrido. <sup>(8)</sup>

Las actividades enzimáticas son ampliamente utilizadas para diferenciar a las bacterias. Incluso las bacterias estrechamente relacionadas pueden ser separadas en especies diferentes mediante el empleo de pruebas bioquímicas, por ejemplo para determinar su capacidad de fermentar un conjunto de hidratos de carbono seleccionados. <sup>(8)</sup>

El bacteriólogo utiliza algunos ensayos bioquímicos simples; estos ensayos distinguen entre bacterias de diferentes géneros y especies mediante la detección de diferencias en su metabolismo. Por ejemplo, el ensayo puede distinguir entre especies que pueden o no fermentar un determinado carbohidrato, o que sintetizan diferentes productos cuando metabolizan un sustrato determinado. A continuación se describen una serie de ensayos (de los muchos existentes) que frecuentemente se llevan a cabo en los laboratorios bacteriológicos. <sup>(12)</sup>

### 2.6.5.1 Producción de catalasa

La catalasa es una enzima que posee hierro y cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno; es sintetizada por la mayor parte de las bacterias aeróbicas, y realiza la destoxificación del peróxido de hidrógeno producido durante el metabolismo aerobio. El ensayo de la catalasa se utiliza para detectar la presencia de catalasa de una cepa bacteriana determinada. Esencialmente, la bacteria se expone a peróxido de hidrógeno y la aparición de burbujas de gas (oxígeno) indica la presencia de catalasa. En la forma tradicional del ensayo, una pequeña porción de crecimiento bacteriano se transfiere, con un asa de siembra a un portaobjetos y se le agrega una gota de peróxido de hidrógeno.<sup>(12)</sup>

Algunas bacterias (por ejemplo ciertas cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* (*Streptococcus faecalis*) producen pseudocatalasa, una enzima carente de hierro que se comporta como catalasa.<sup>(12)</sup>

### 2.6.5.2 La prueba de la oxidasa

Este ensayo detecta un tipo determinado de cadena respiratoria: el que contiene un citocromo C terminal y está asociado a la oxidasa. Las bacterias que poseen esta cadena respiratoria pueden oxidar productos químicos como el reactivo de la oxidasa de Kovacs (dihidrocloruro de tetrametil-*p*-fenilenodiamina 1%); los electrones se transfieren sucesivamente desde este reactivo hasta el citocromo C y, a través de la oxidasa, hasta el oxígeno. El reactivo desarrolla un intenso color violeta cuando se oxida de esta forma. Para realizar el ensayo, se humedece una pequeña zona de papel de filtro estéril con unas pocas gotas del reactivo de la oxidasa de Kovacs, y seguidamente se transfiere una pequeña cantidad de cultivo bacteriano al papel de filtro húmedo con una espátula de vidrio o un asa de siembra de platino (pero no con un asa de níquel-cromo); las especies oxidasa-positivas dan lugar a una coloración violeta inmediatamente o en 10 segundos. Entre las bacterias oxidasa-positivas se encuentran, por ejemplo, especies de *Neisseria*, *Pseudomonas* y *Vibrio*; sin embargo se obtiene reacción negativa, por ejemplo, con miembros de la familia Enterobacteriaceae.<sup>(12)</sup>

### 2.6.5.3 La prueba de la oxidación-fermentación (O/F)

Este antiguo ensayo (prueba de Hugh & Leifson) sirve para determinar si un microorganismo emplea el metabolismo oxidativo (respiratorio) o el fermentativo para la utilización de un carbohidrato determinado (normalmente glucosa). Dos tubos de ensayo se llenan hasta una profundidad de alrededor de 8 cm con un medio de peptona-agar, el cual contiene el carbohidrato determinado y un indicador de pH, azul de bromotimol, que colorea el medio de verde (pH 7.1). Uno de los tubos se calienta al vapor (para eliminar el oxígeno disuelto) y se enfría rápidamente justo antes de su utilización. Cada tubo se inocula en picadura con el organismo de ensayo hasta una profundidad de alrededor de 5 cm; en el tubo calentado al vapor el medio se cubre inmediatamente con una capa de parafina líquida estéril de alrededor de 1 cm de profundidad (para excluir el oxígeno). Ambos tubos se incuban y posteriormente se examina la utilización de carbohidratos, es decir, producción de ácido, indicada por el amarilleo del indicador de pH. <sup>(12)</sup>

Los organismos respiradores (como ciertas especies de *Pseudomonas*) dan lugar al viraje a color amarillo solamente en el medio no cubierto (aeróbico). *Escherichia coli* vira al amarillo ambos medio: (I) en el medio cubierto fermenta la glucosa y (II) en el medio no cubierto la glucosa es atacada en primer lugar por la respiración y después por la fermentación. <sup>(12)</sup>

### 2.6.5.4 Producción de ácido/gas a partir de carbohidratos (azúcares)

En algunos géneros se pueden distinguir las especies por diferencias en los tipos de carbohidratos (azúcar) que pueden metabolizar. El rango de azúcares utilizado por un organismo particular puede determinarse simplemente creciendo el organismo en una serie de medios, cada uno de los cuales contiene un azúcar diferente (como fuente de carbono) y un sistema para detectar la utilización del azúcar. El medio puede estar basado en peptona-agua o caldo nutritivo y contiene, además del azúcar, un indicador de pH para detectar la acidificación debida al metabolismo del azúcar. <sup>(12)</sup>

Los medios de ensayo generalmente se colocan en tubos de ensayo con rosca y tapa de baquelita, los cuales contienen un tubo Durham invertido para recoger el gas que se puede generar durante el metabolismo del azúcar. <sup>(12)</sup>

### 2.6.5.5 Los ensayos IMViC

Los ensayos IMViC son un grupo de pruebas utilizadas específicamente para identificar bacterias de la familia Enterobacteriaceae. IMViC deriva de: prueba del indol, prueba del rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer y prueba del citrato.<sup>(12)</sup>

**La prueba del indol.** Esta prueba detecta la capacidad de un organismo para producir indol a partir del aminoácido triptófano. El organismo se crece en agua peptonada o triptona-agua durante 48 horas; entonces se añade al cultivo el reactivo indol de Kovacs y el recipiente cerrado se agita suavemente. Cuando el ensayo resulta positivo, el indol (presente en el cultivo) se disuelve en el reactivo, el cual vira a color rosa, o rojo, formando una capa en la superficie del medio.<sup>(12)</sup>

**La prueba del rojo de metilo (prueba MR).** La prueba MR detecta la capacidad de un organismo, el cual se crece en un medio de glucosa-peptona tamponado con fosfato, para producir suficiente ácido (a partir del metabolismo de la glucosa) como para reducir el pH del medio desde 7.5 hasta alrededor de 4.4 o menos. El medio se inocula y se incuba al menos durante 48 horas a 37 °C; seguidamente el pH del cultivo se analiza mediante la adición de unas pocas gotas de rojo de metilo al 0.04%; el cultivo adquiere color rojo cuando el organismo es MR-positivo.<sup>(12)</sup>

**La prueba de Voges-Proskauer (prueba VP).** Esta prueba detecta la capacidad de un organismo para formar acetoina (acetilmetilcarbinol). Un medio de glucosa-peptona tamponado con fosfato se inocula con la cepa de ensayo y se incuba a 37 °C durante 2 días o a 30 °C durante al menos 5 días. Una de las formas de realizar la prueba (método de Barritt) consiste en añadir secuencialmente a 1 mL de cultivo los siguientes compuestos: 0.6 mL de una solución etanólica de  $\alpha$ -naftol al 5% y 0.2 mL de una solución de hidróxido potásico al 40%; seguidamente el tubo se agita vigorosamente, se coloca en una posición inclinada y se examina. La acetoina (si está presente) aparentemente se oxida a diacetil ( $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$ ), el cual da lugar a una coloración roja (prueba positiva VP) en las condiciones del ensayo.<sup>(12)</sup>

**La prueba del citrato.** Esta prueba detecta la capacidad de un organismo para utilizar citrato como única fuente de carbono. Los medios usados, por ejemplo, el medio citrato de Koser (líquido) y el agar citrato de Simmons (sólido) poseen ácido cítrico o citrato, fosfato diácido de amonio (como fuente de nitrógeno y fósforo), cloruro sódico y sulfato magnésico. A partir de un cultivo en medio sólido se prepara una solución salina del organismo de ensayo; con la suspensión se inocula el medio de Koser utilizando un asa de siembra recta y, seguidamente, se

incuba comprobando si existe crecimiento (turbidez) tras uno o dos días. Los organismos que crecen en el medio se clasifican como citrato-positivos. En el método con agar citrato de Simmons, se realiza un sembrado en estría depositando con un asa bacteriológica una pequeña cantidad de muestra del organismo en ensayo. Si presenta cambios de coloración (pasar de una coloración verde a azul) se dice que el organismo es citrato positivo. <sup>(12)</sup>

#### **2.6.5.6 La prueba de la reducción de nitrato**

Esta prueba detecta la capacidad de un organismo para reducir nitrato (por ejemplo enterobacterias y *Pseudomonas*). El organismo se crece durante uno o más días en caldo de nitrato y seguidamente se examina la evidencia de reducción de nitrato en el medio. Para determinar la presencia de nitrito, se añaden al cultivo 0.5 mL de ácido acético 5N, 0.5 mL de  $\alpha$ -naftilamina y 0.5 mL de ácido sulfanílico 0.8%; estos reactivos se unen a cualquier nitrito presente formando un colorante azoderivado rojo soluble. La ausencia de coloración roja podría significar (I) que el nitrato no ha sido reducido o (II) que se ha formado nitrito, pero éste ha sido reducido posteriormente, por ejemplo, a nitrógeno o amonio. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se analiza en el medio la presencia de nitrato mediante la adición de cantidad traza de polvo de zinc, el cual reduce el nitrato a nitrito; si hay nitrato presente (es decir, que no ha sido reducido por el organismo de ensayo), la adición de zinc dará lugar a una coloración roja, ya que el nitrito recién formado reaccionará con los reactivos presentes en el medio. <sup>(12)</sup>

#### **2.6.5.7 Reducción en leche de tornasol**

Muchas especies de bacterias dan lugar a reacciones características cuando crecen en leche tornasol (leche descremada que contiene tornasol como indicador de pH). Una determinada cepa bacteriana puede producir uno o más de los siguientes efectos (I) ningún cambio visible, (II) producción de ácido a partir del azúcar de la leche (lactosa), lo cual se detecta con tornasol, (III) producción de álcali, normalmente debida a la hidrólisis de la proteína de la leche (caseína), (IV) reducción (decoloración) del tornasol, (V) producción de un coágulo ácido, soluble en álcali, (VI) formación de un coágulo a (o alrededor de) pH 7 debido a la acción de enzimas similares a renina producidas por la bacteria y (VII) producción de ácido y gas formándose un coágulo tormentoso: un coágulo alterado e impregnado de burbujas de gas. <sup>(12)</sup>

### 2.6.5.8 Hemólisis

Cuando ciertas bacterias crecen en agar sangre, cada colonia aparece rodeada por un halo de medio diferenciado en el que los eritrocitos han sido lisados o en el que la sangre ha sido decolorada; la lisis de los eritrocitos (hemólisis) se debe a la actividad de ciertas proteínas (hemolisinas) liberadas por las bacterias. Algunas especies dan lugar a una hemólisis transparente incolora que contrasta marcadamente con el medio rojo opaco; este es el caso, por ejemplo, de *Streptococcus pyogenes* y de varias cepas de *Staphylococcus aureus*, (En el caso de *Streptococcus*, la hemólisis transparente se denomina  $\beta$ -hemólisis, mientras que la originada por *S. aureus* se denomina  $\alpha$ -hemólisis; probablemente es mejor referirse a este tipo de hemólisis simplemente como hemólisis clara).<sup>(12)</sup>

### 2.6.5.9 Agar Mac Conkey

El agar Mac Conkey es un medio empleado frecuentemente para separar las bacterias fermentadoras de lactosa de aquellas que no la fermentan, provenientes de agua, alimentos y muestras clínicas. Contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben a bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas que no pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Contiene lactosa, único carbohidrato y rojo neutro como indicador de pH, cuyo ámbito de viraje está entre pH 8.0 (amarillo) y pH 6.8 (rojo). Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias que varían en el tono de rojo: rojo fucsia o incoloras con el centro rosado, depende de la cantidad de ácido producido y las no fermentadoras de lactosa producen colonias incoloras. En este caso, el medio adquiere un ligero tono amarillo, pues las bacterias utilizan las peptonas y alcalinizan el medio de cultivo.<sup>(13)</sup>

### 2.6.5.10 Prueba de licuefacción de gelatina

La gelatina, una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina. Las enzimas capaces de producir gelatinolisis se denominan gelatinasas. Estas enzimas proteolíticas a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos.<sup>(14)</sup>

Las proteínas naturales son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por ende, para que una célula pueda usar las proteínas, estas primero deben ser catabolizadas a componentes más pequeños. Ciertas bacterias segregan gelatinasas exocelulares para degradar las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana. <sup>(14)</sup>

#### **2.6.5.11 Prueba de movilidad**

Esta prueba determina si un microorganismo es móvil o inmóvil.

Las bacterias son móviles por medio de flagelos. Los flagelos aparecen sobre todo entre los bacilos (bacterias con forma de bastoncillo); sin embargo, unas pocas formas cocoides son móviles. Las bacterias móviles pueden contener un único flagelo o muchos flagelos y su ubicación varía según las especies bacterianas y las condiciones de cultivo. En ocasiones, las bacterias móviles producen variantes inmóviles que parecen estables y en raras oportunidades reversionan a las formas móviles. Los microorganismos inmóviles carecen de flagelos. <sup>(14)</sup>

#### **2.6.5.12 Prueba de la hidrólisis del almidón**

Cuando el almidón (amilosa) es hidrolizado por la acción de exoenzimas amilasas, se degrada a maltosa (disacárido de dos glucosas) y glucosa. Estos azúcares son transportados al citoplasma de la célula y usados como fuente de carbono y fuente de energía. <sup>(15)</sup>

La prueba se realiza en agar almidón. Se siembra por estría la placa del medio y se incuba por 24 horas a 37 °C. Se utiliza reactivo de Lugol para observar la hidrólisis del almidón. <sup>(15)</sup>

El almidón reacciona químicamente con yodo para producir un color azul oscuro cuando las moléculas de yodo se insertan en los huecos de la molécula espiralada del almidón (amilosa). Este resultado es debido a que la molécula absorbe más luz visible excepto el azul. Si el almidón se descompone en maltosa y glucosa, no se desarrolla ningún color debido a que desaparece la espiral y no quedan los huecos para que entre el yodo. Esta ausencia de color está asociada con la hidrólisis del almidón. <sup>(15)</sup>

## **2.6.6 Hongos**

La ciencia que estudia los hongos se denomina Micología. Esta ciencia incluye el estudio de los hongos filamentosos llamados mohos, y de los hongos unicelulares, llamados levaduras. <sup>(16)</sup>

Los hongos son organismos eucariontes, por lo que poseen núcleos verdaderos, así como todas las estructuras internas características de estas células. Poseen, además una pared gruesa, semejante en grosor y en composición química a la pared de las células vegetales. Sin embargo, los hongos no son fotosintéticos y aunque algunos, como las setas, semejan plantas, no poseen hojas, tallos ni raíces. <sup>(16)</sup>

Estos organismos son heterótrofos: para su nutrición, requieren de compuestos orgánicos, obteniendo su alimento de la materia orgánica en descomposición (organismos saprófitos); o se alimentan de otros seres vivos (organismos parásitos). <sup>(16)</sup>

### **2.6.6.1 Cultivo e identificación de los hongos**

Para evitar contaminaciones por las esporas de los hongos filamentosos, las muestras se siembran en tubos de agar inclinado cuya boca estrecha dificulta la difusión de las esporas cuando se abren. Sin embargo, las muestras de las que no se espera el crecimiento de hongos filamentosos o dimórficos, sino tan solo de levaduras, como las muestras de orina, los exudados vaginales u orales, pueden sembrarse en medios vertidos en placas Petri. <sup>(17)</sup>

Los medios usuales utilizados en bacteriología permiten el crecimiento de hongos, pero en Micología se utilizan medios específicos, como el de Sabouraud, muy rico en glucosa y cuyo pH bajo (pH 5.0-5.6) dificulta el crecimiento de las bacterias facilitando el crecimiento de los hongos. Para incrementar este carácter selectivo frente a las bacterias se puede añadir al medio de Sabouraud diversos antibacterianos, como el cloranfenicol, la gentamicina entre otros, y ajustar el pH entre 6.5 y 7.2, más favorable para el crecimiento de los hongos. <sup>(17)</sup>

Existen medios cromogénicos, como el CHROMagar Candida con buena capacidad diferencial para las levaduras, al revelar determinadas actividades enzimáticas por la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico incorporado al medio. <sup>(17)</sup>

Los hongos son aerobios estrictos, aunque excepcionalmente algunas levaduras son anaerobias facultativas; por ello, en el laboratorio de Micología médica, los medios siempre se incuban en aerobiosis. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos patógenos se sitúa entre 28 y 30 °C. <sup>(17)</sup>

Los hongos tienen un crecimiento más lento que la mayoría de las bacterias, por lo que es adecuado mantener los cultivos durante cuatro semanas, excepto si se espera el crecimiento de levaduras, en cuyo caso suele ser suficiente incubar los cultivos por un periodo máximo de dos o tres días. <sup>(17)</sup>

### **2.6.6.2 Identificación de los hongos**

La identificación de los hongos se basa en tres caracteres: 1) el aspecto macroscópico de las colonias y su observación microscópica, que permite confirmar si se trata de hongo levaduriformes o filamentosos, 2) las características bioquímicas, útiles para la identificación de las levaduras y 3) la morfología microscópica, que permite identificar los hongos filamentosos. <sup>(17)</sup>

### **2.6.6.3 Morfología macroscópica de las colonias**

Los hongos levaduriformes dan lugar a colonias semejantes a las bacterias, cremosas, opacas, con un diámetro de 3 a 7 mm, y en general de crecimiento relativamente rápido (24-72 horas). <sup>(17)</sup>

Los hongos filamentosos dan lugar a colonias de mayor tamaño (10-30 mm), que crecen radialmente de modo progresivo, de aspecto inconfundible, vellosas, algodonosas o pulverulenta, de vistosos y variados colores, que deben ser observados en el anverso y reverso, donde puede verse si el pigmento difunde al medio. Su crecimiento suele ser más lento que el de las levaduras (3-20 días), pero pueden llegar a invadir toda la superficie del medio de cultivo. El color, forma y tamaño de las colonias puede variar según el medio de cultivo utilizado. <sup>(17)</sup>

El examen microscópico de los cultivos se efectúa de modo diferente según se trate de colonias pertenecientes a hongos levaduriformes o filamentosos. Los primeros se observan efectuando una suspensión de la colonia en una gota de solución salina depositada sobre un portaobjetos y observándola en fresco, contrastándola con azul de lactofenol o fijándola y tiñéndola por la técnica de Gram. Para la observación microscópica de las colonias filamentosas, se toma un pequeño fragmento de las mismas, cortado con el asa micológica, o se recoge parte del micelio aéreo tocando la superficie de la colonia con la cara adhesiva de

un fragmento de cinta adhesiva transparente que se transfiere a un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol para su coloración. La técnica de la cinta adhesiva (celo) permite una mejor observación de la morfología y la disposición óptima de las estructuras de reproducción asexual, resultando el método de elección si se pretende la identificación de los hongos filamentosos. <sup>(17)</sup>

#### **2.6.6.4 Identificación de las levaduras**

Los hongos levaduriformes se identifican fundamentalmente mediante pruebas metabólicas semejantes a las bacteriológicas; aunque determinados aspectos complementarios como el pigmento rojo de las colonias de *Rhodotorula*, la presencia de cápsula en *Cryptococcus*, la producción de pseudofilamentos en algunas especies de *Candida*, la producción de tubos germinativos (verdaderos filamentos) ayudan a su identificación. <sup>(17)</sup>

Las pruebas metabólicas más utilizadas son la fermentación y asimilación de diversos hidratos de carbono. La fermentación de los hidratos de carbono se detecta en medio líquido con campana invertida de Durham, debido a la producción de gas (CO<sub>2</sub>) por la capacidad de la levadura de atacar los azúcares por vía fermentativa. <sup>(17)</sup>

Otras pruebas adicionales utilizadas para la identificación de levaduras son la producción de ureasa, la reducción de los nitratos, la exigencia de factores específicos de crecimiento y la resistencia a la cicloheximida, entre otras. <sup>(17)</sup>

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de formas farmacéuticas estériles está sujeta al cumplimiento de requisitos más rigurosos que cualquier otra área de la industria farmacéutica; con ellos se busca minimizar los riesgos de contaminación microbiana, de partículas y de pirógenos en el producto final.

En la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, apartado 10.4 se estipulan los requerimientos que deben ser cumplidos antes, durante y después de la fabricación de un producto estéril. Entre estos requisitos está el diseño de construcción, la capacitación del personal que labora en el área, el mantenimiento de los equipos, áreas y sistemas críticos, así como el establecimiento de un programa de monitoreo ambiental adecuado.<sup>(4)</sup>

La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM cuenta en sus instalaciones con una planta piloto farmacéutica, en donde los alumnos de la carrera de Química Farmacéutico Biológica adquieren los conocimientos y habilidades necesarias para su futura inserción en el campo laboral. Es aquí donde puede ser parte del proceso de producción de un producto estéril, pero antes de iniciar cualquier proceso de fabricación (tanto en la industria como en la planta piloto farmacéutica) es obligatorio llevar a cabo el monitoreo ambiental del área.

El monitoreo ambiental del área involucra comprobar la esterilidad de la vestimenta, material e incluso de los insumos que forman parte del producto final, así como la evaluación de la limpieza y sanitización del área, pero es sin lugar a duda el personal y el sistema de aire (si no recibe mantenimiento periódico) las principales fuentes de contaminación del producto.

En investigaciones anteriores se ha comprobado que el área aséptica de la planta piloto farmacéutica presenta una carga tanto de partículas viables como no viables mayor a la permitida para áreas asépticas y no cuenta con un rol de sanitizantes adecuado. Es por ello que es necesario evaluar la calidad del aire y caracterizar e identificar de manera precisa a los microorganismos (bacterias y hongos) presentes. Con esto se generará información necesaria para establecer las primeras acciones; una de ellas deberá ser la implementación de un rol adecuado de sanitizantes, así como el mantenimiento del área, lo cual generará la optimización de los procesos de producción y llenado aséptico.<sup>(2)</sup>

## **4 OBJETIVOS**

### **General**

4.1 Caracterizar e identificar la carga microbiana del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM; evaluando las condiciones del área y la calidad del sistema de aire con el que cuenta, teniendo como finalidad, obtener información necesaria para optimizar las condiciones de esterilidad con las que debe de operar el área.

### **Particulares**

4.2 Conocer y dominar la técnica de doblado, esterilización y vestido del uniforme utilizado en el área aséptica para cumplir con el protocolo para ingresar a dicha área.

4.3 Realizar la limpieza y sanitización de los distintos cuartos que integran el área aséptica con el fin de minimizar la carga microbiana.

4.4 Llevar a cabo el monitoreo ambiental del área aséptica con el fin de evaluar la carga microbiana presente.

4.5 Realizar la caracterización macroscópica y microscópica de los microorganismos (hongos y bacterias) aislados del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

4.6 Realizar pruebas bioquímicas a las muestras de bacterias que se aíslan del área aséptica, identificando así el género al que pertenecen.

## **5 HIPÓTESIS**

El área aséptica con la que cuenta la planta piloto farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM se ha descuidado en cuanto a su mantenimiento, lo que trae como consecuencia la proliferación por encima de los límites preestablecidos de bacterias y hongos.

Caracterizar e identificar de manera precisa a cada microorganismo presente proporcionará la información necesaria para implementar a futuro medidas de limpieza que en específico atenúen y, junto con el mantenimiento adecuado del área, eliminen la carga microbiana identificada.

## **6 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Materiales**

#### **6.1.1 Limpieza y sanitización del área aséptica**

- Tela magitel
- Cubetas
- Mop
- Jalador
- Atomizador

#### **6.1.2 Monitoreo del área aséptica**

- Marcos de acero de 12.5 x 12.5 cm
- Marcos de papel de 12.5 x 12.5 cm
- Hisopos
- Uniforme para área aséptica (overol, escafandra, botas, cubrebocas, cofia, guantes y lentes de seguridad)
- Bolsas de plástico grandes para esterilizar
- Bolsas de papel chicas para esterilizar

#### **6.1.3 Filtración aséptica**

- Tanque dispensador presurizable
- Porta filtros de acero inoxidable de 90 mm
- Tapones horadados
- Matraz Erlenmeyer 3 L
- Cinta teflón
- Abrazaderas
- Desarmador plano y de cruz
- Llaves Allen (5/64" y 5/16")
- Manómetro Bourdon Bronce (0-11 Kg/cm<sup>2</sup>)
- Mangueras de silicón
- Filtros de 90 mm; poro 20  $\mu$ m
- Pinzas de bordes planos

#### **6.1.4 Preparación de medios de cultivo y caracterización de microorganismos**

- Tubos de ensayo con tapón
- Gradilla
- Cajas Petri de 90 mm
- Portacajas
- Portapipetas
- Pipetas graduadas de 2 mL
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Matraz Erlenmeyer de 1 L
- Vaso de precipitados de 50 mL

- Vaso de precipitados de 150 mL
- Vaso de precipitados de 600 mL
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 1 L
- Mechero Fisher
- Tripie
- Triángulo de asbesto
- Termómetro de inmersión parcial (-10 °C a 100 °C)
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Jeringa de 10 mL
- Asa bacteriana

## **6.2 REACTIVOS**

- Solución detergente BACTE (1.6%)
- Hipoclorito de sodio al 1% (sanitizante)
- Alcohol etílico al 70%
- Tween 60 al 10%
- Solución salina isotónica al 0.9%
- Agua estéril para uso inyectable
- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol-Acetona (1:1)
- Safranina
- $\alpha$ -naftol al 5%
- Hidróxido de potasio al 40%
- Ácido acético 5 N
- Peróxido de hidrógeno
- $\alpha$ -naftil amina 0.5%
- Ácido sulfánilico 0.8%
- Azul de lactofenol
- Dextrosa

### **6.3 EQUIPOS**

- Incubadora Felisa. INV UNAM. 2131766
- Contador de partículas Lighthouse Worldwide Solution (Handheld 3016) INV UNAM 02253860
- Autoclave cilíndrica Evar. INV UNAM. 02241903
- Balanza analítica Ohaus, Modelo PA214. INV UNAM. 02339954
- Balanza granataria Ohaus, Modelo Scout Pro. INV UNAM. 1005011
- Tanque de filtración Millipore, Waukesha, W.I. U.S.A. INV UNAM. 022714
- Microscopio Ross Bach. No de serie 771106. INV. UNAM. 206312

### **6.4 MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar dextrosa Sabouraud (ADS) Marca BD Bioxon. Lote 1280573
- Agar soya tripticaseina (AST) Marca BD Bioxon. Lote 9051360
- Agar base. Marca Becton Dickinson. Lote 1255089
- Agar citrato de Simmons. Marca Diagnóstica Merck. Lote 71040
- Caldo RMVP. Marca DIBICO. Lote 0364094
- Caldo nitrato. Marca BD Bioxon. Lote 8246775
- Medio MIO. Marca DIBICO. Lote 7280076
- Agar almidón. Marca Becton Dickinson. Lote 9070323
- Gelatina nutritiva. Marca Bioxon. Lote 510L8A
- Litmus milk. Marca Becton Dickinson. Lote 5134825
- Medio O/F glucosa de Hugh & Leifson. Marca Becton Dickinson. Lote 07K26142
- Caldo rojo de fenol. Marca Becton Dickinson. Lote 19G10791

### **6.5 MATERIAL BIOLÓGICO**

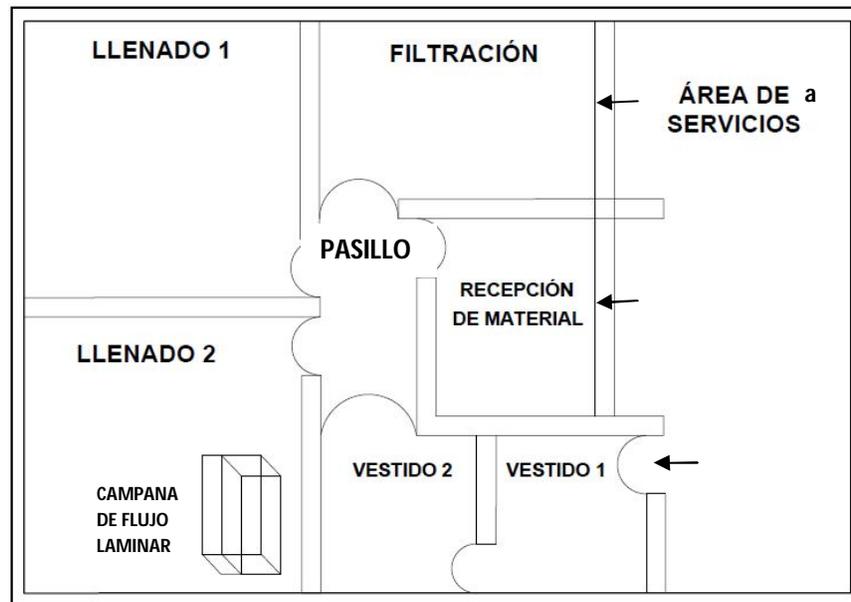
- Sangre de carnero estéril

## 6.6 PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

### 6.6.1 Limpieza del área aséptica

El proyecto comenzó con la limpieza del área aséptica de la planta piloto de la FES Zaragoza UNAM, la cual está integrada por los cuartos de Vestido 1 y Vestido 2, el pasillo, los cuartos de Llenado 1, Llenado 2, Recepción de material y el cuarto de Filtración (DIAGRAMA 1). Todos los espacios se limpiaron y sanitizaron siguiendo el “Procedimiento Normalizado de Operación de Limpieza de Áreas Asépticas (PNO-0172-08-01)”<sup>(18)</sup>

**DIAGRAMA 1.** Diagrama del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM.



**a=** La sección de la planta piloto farmacéutica denominado “Área de Servicios” no forma parte del área aséptica. Se visualiza en el diagrama porque por este lugar ingresa tanto el personal (Vestido1) como el material (Recepción de material y túnel del área de Filtración) al área aséptica.

Cada cuarto se limpió comenzando por el techo, seguido de las paredes, ventanas y puertas, finalizando con el piso. De esta manera se llevó un orden en la limpieza; yendo de las superficies más limpias a las menos limpias. La solución detergente empleada fue Bacté al 1.6%, la cual se distribuyó por las superficies abarcando tramos de aproximadamente un metro cuadrado (1 m<sup>2</sup>) con ayuda de tela magitel (esta tela no desprende pelusas), hasta cubrir toda la superficie para después retirar el exceso con otro paño humedecido de agua destilada. <sup>(18)</sup>

- El techo se limpió con movimientos en forma de zigzag.
- Las paredes se limpiaron con movimientos en forma de zigzag comenzando desde la parte superior hasta llegar al piso.
- La campana de flujo laminar y la mesa de trabajo se limpiaron con movimientos en forma de zigzag.
- Las puertas y ventanas se limpiaron con ayuda del jalador con esponja, por medio de movimientos en forma de zigzag comenzando desde la parte superior hasta la inferior, retirando el exceso de Bacté con el jalador.
- Con ayuda del mop se limpió el piso, con movimientos en forma de zigzag empezando desde el fondo del cuarto hasta llegar por último a la puerta.

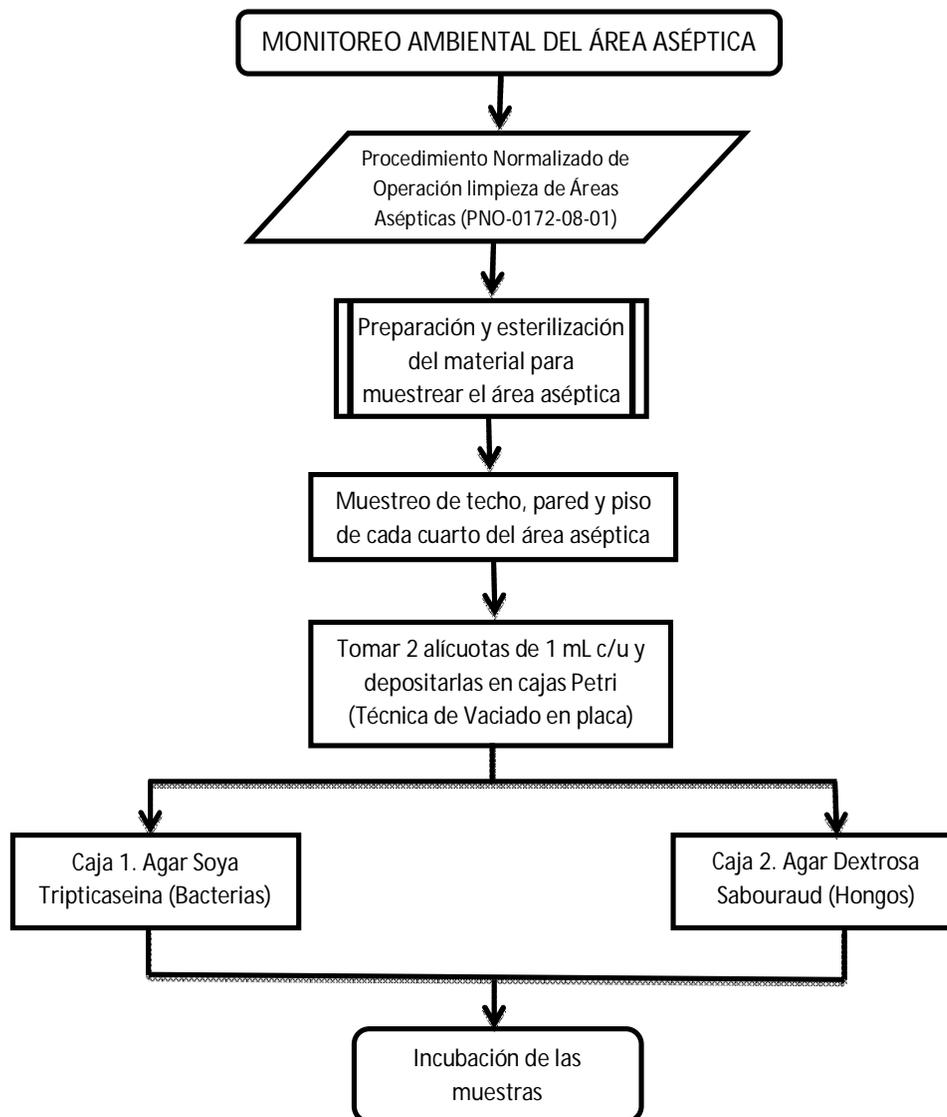
La sanitización se realizó con Hipoclorito de sodio al 1 % en forma de aspersion, dejando actuarlo por 24 horas previas a la sesión de trabajo y muestreo.

La limpieza y sanitización se realizó con agua destilada.

Toda la limpieza se llevó a cabo con el uniforme de áreas de producción de formas farmacéuticas no estériles (bata, zapatos blancos, cofia y cubre bocas) mientras que el proceso de sanitización se realizó con el uniforme de área aséptica, previamente esterilizado.

Al concluir la sanitización del área se selló la entrada de acceso al cuarto de vestido 1 con masking tape y se identificó como "Área sanitizada. Prohibido el paso".

Todo el proceso; desde la limpieza hasta la sanitización del área aséptica se realizó con la UMA encendida.



**DIAGRAMA 2.** Metodología realizada para el monitoreo ambiental del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM.

### 6.6.2 Monitoreo ambiental del área aséptica

- El diagrama 2 muestra de manera general la metodología empleada para el monitoreo ambiental del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM.
- Para la evaluación de las condiciones de esterilidad del área aséptica se esterilizaron 44 cajas Petri y 21 pipetas graduadas de 1 mL con calor húmedo (autoclave) a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos.

- El monitoreo ambiental del área aséptica consistió en preparar 21 tubos de ensayo con tapa de baquelita los cuales contenían 9 mL de solución salina (0.9 %) y 1 mL de Tween 80 al 10 % esterilizados con calor húmedo (autoclave) a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos conforme a lo indicado en el “Procedimiento Normalizado de Operación de Limpieza de Áreas Asépticas (PNO-0172-08-01)” <sup>(18)</sup>
- Los 21 marcos de acero inoxidable de 10 cm<sup>2</sup> que se utilizaron para delimitar el área de muestreo también se esterilizaron por calor húmedo (autoclave) a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos.
- La sesión de trabajo tuvo lugar transcurridas 24 horas después de haber sanitizado el área aséptica. Antes del ingreso se encendió la UMA de 15 a 30 minutos antes de trabajar en el área.
- Para preservar las condiciones de esterilidad presentes en el área, al momento de ingresar a muestrear, se preparó con anticipación un par de uniformes especiales para área aséptica. El uniforme está conformado por overol, escafandra, botas, cubrebocas, cofia y 2 pares de guantes, los cuales fueron doblados y guardados en una bolsa para esterilizar. Se esterilizaron por calor húmedo (autoclave) a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos conforme a lo descrito en el “Procedimiento Normalizado de Operación Para la Preparación y Esterilización del Uniforme de Áreas Asépticas (PNO-0100-08-01)” <sup>(19)</sup>
- Para ingresar al área aséptica primero fue necesario cambiarse el uniforme de la planta por el de áreas asépticas. Esto se realizó en el área de Vestido 1 y conforme el “Procedimiento Normalizado de Operación para el vestido del Uniforme de Área Aséptica (PNO-0099-08-01)”. <sup>(20)</sup>
- Una vez dentro del área aséptica se realizó el muestreo ambiental, ingresando los tubos de ensayo con solución salina en una gradilla sanitizada con alcohol al 70 %, los hisopos y los marcos de acero inoxidable estériles a través del túnel de luz UV que se encuentra en el área de Filtrado al cuarto de servicios.
- Una vez ingresados los tubos, se depositó en cada uno de ellos un hisopo estéril. Con ayuda de los marcos de acero inoxidable se delimitó la superficie de muestreo y con el hisopo humedecido de solución salina se tomó la muestra. El movimiento para muestrear fue en forma de zigzag,

recorriendo toda el área delimitada por el interior del marco de acero (10 cm<sup>2</sup>). Se volvió a guardar cada hisopo en el tubo correspondiente y se identificó cada muestra. De esta forma se obtuvo muestras de techo, pared y piso de cada cuarto que conforma el área aséptica (Filtrado, Llenado 1, Llenado 2, Pasillo, Recepción de material, vestido 1 y vestido 2).

- De cada muestra se tomaron 2 alícuotas de 1 mL y se depositaron en cajas Petri, realizando así la técnica de vaciado en placa. Para la identificación de bacterias se prepararon 450 mL de medio de cultivo agar Soya Trypticaseina y se agregó seguido de la muestra alrededor de 20 mL por cada caja de agar fundido (21 muestras más 1 caja blanco). Se dejó solidificar y se llevó a incubación a 37 °C por 72 horas. Para el caso de la identificación de hongos se prepararon 450 mL de medio de cultivo agar Dextrosa Sabouraud, adicionando alrededor de 20 mL por cada caja Petri con alícuota de muestra (21 muestras más 1 caja blanco). Una vez solidificada se prosiguió a incubarla a 25 °C por un periodo de 7 días.
- Terminado el muestro de partículas viables se pasaron los tubos que ya contenían los hisopos dentro y los marcos de acero a través del túnel y siguió el monitoreo de las partículas totales.
- El monitoreo de partículas totales se realizó con el Contador de partículas Lighthouse Worldwide Solution (Handheld 3016). Cada muestra tomada en los diferentes cuartos que integran el área aséptica se tomó a la misma altura, para ello se dejaba funcionando encima de la mesa de trabajo y en el centro del cuarto. La cantidad de partículas y sus diferentes tamaños se registraron en el contador de partículas. Terminando el muestreo se apagó el contador de partículas y se retiró del área a través del túnel de luz UV. Todo esto con la UMA encendida.

### **6.6.3 Utilización del tanque de filtración por membrana**

Para los fines de este proyecto se consideraron como espacios críticos del área aséptica el cuarto de vestido 1 y vestido 2, así como el pasillo y el cuarto de filtración; ya que son estos los lugares por donde se ingresa y se lleva a cabo el proceso de filtración por membrana en condiciones estériles.

- El aire comprimido se purgó durante 1 hora antes de comenzar con el proceso de esterilización.

- Se reprodujo un proceso de esterilización que consistió en utilizar el Tanque de filtración Millipore, Waukesha, W.I. U.S.A. evaluando así las condiciones asépticas del área.
- Se comenzó por esterilizar las piezas del tanque que iban a estar expuestas dentro del área aséptica: la manguera que conectó el área aséptica con el cuarto de servicios, las mangueras del portafiltro, tapones de plástico horadado No. 5, abrazaderas, 2 llaves Allen y 1 desarmador. Todas estas piezas se esterilizaron en bolsa para esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos.
- Para recibir el agua destilada filtrada dentro del área aséptica se utilizó un matraz Erlenmeyer con capacidad de 4 litros esterilizado con calor húmedo (autoclave) a 120 °C y 15 lb de presión por 15 minutos.
- El portafiltro Millipore se armó conforme a lo especificado en el “Procedimiento Normalizado de Operación para el Uso y Armado del Equipo de Filtración por Membrana (PNO-0117-08-09)”, se le colocó la membrana de 90 mm al igual que un prefiltro. Todas las piezas y portafiltro fueron esterilizados por calor húmedo (autoclave) a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos. <sup>(21)</sup>
- El tanque de filtración por membrana solo se lavó con solución de Extran y se enjuagó con agua destilada, sanitizándolo al final con una solución de Hipoclorito de sodio al 1 %.
- La solución salina se colocó en el tanque para filtración, el cual se conectó por medio de mangueras a la llave de aire comprimido (cuarto de servicios), misma llave a la que se le adaptó un manómetro.
- Una vez concluido el monitoreo ambiental se introdujo el portafiltro, la bolsa para esterilizar con mangueras de silicón, tapones, abrazaderas, llaves Allen y desarmador, así como el matraz Erlenmeyer de 4 L estéril.
- Para comenzar la filtración se abrió la bolsa para esterilizar y se apretaron los tornillos de la junta tórica del portafiltro con ayuda de las llaves Allen. Las mangueras se conectaron con las abrazaderas; una de ellas se pasó por el orificio que conecta el área de filtrado con el cuarto de servicios; orificio en el cual se colocaron los tapones horadados (uno de cada lado). La manguera se conectó al tanque ubicado en el área de servicios, el cual

ya se encontraba conectado al aire comprimido. La otra manguera se conectó a la salida del portafiltro la cual transportó el agua que se utilizó para evaluar la esterilidad del proceso, hasta el matraz Erlenmeyer de 4 L que se encontraba listo para recibir el filtrado.

- Una vez que el equipo de filtración estaba listo, el personal dentro del área de filtración dio la señal al personal del área de servicio para abrir la llave del aire comprimido y comenzar así el proceso de filtración por membrana. Cabe señalar que el personal que se encontraba en el área de servicios tuvo que cuidar la presión dentro del tanque. El manómetro no debía indicar una presión superior a los 2.0 Kg/cm<sup>2</sup>.
- Una vez que el matraz se encontraba lleno se dio la orden de bloquear el paso del agua proveniente del área de servicio. De esta manera se terminó el proceso de filtración por lo que todo el material empleado se recogió y se sacó del área por el túnel de luz UV que conecta el área de filtrado con el cuarto de servicio.

#### **6.6.4 Identificación microbiológica**

Lo primero que se realizó con las cajas Petri donde se presentó crecimiento microbiano fue la caracterización macroscópica de las colonias tanto de hongos como de bacterias. Después se realizó el aislamiento y purificación de las muestras obtenidas. Para el caso de los hongos se tomó una pequeña cantidad de muestra con un asa micológica y se depositó en tubos de ensayo con agar dextrosa Sabouraud en pico de flauta. Para las bacterias se realizó el aislamiento de cada colonia en cajas con agar soya tripticaseina, por la técnica de sembrado en estría. Después de la incubación se observaron al microscopio, y una vez que se observaron colonias puras se prosiguió a sembrarlas en tubos de ensayo con agar soya tripticaseina en pico de flauta para su conservación.

El siguiente paso para la identificación de bacterias y hongos fue la caracterización microscópica. Para el caso de los hongos se tomó una pequeña muestra con ayuda de una asa recta, se depositó en un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se cubrió con un cubreobjetos. Observando su estructura microscópica y con las características macroscópicas que ya se tenían registradas fue posible identificar el género al que pertenecía. Las bacterias requirieron para ser identificadas la realización de pruebas bioquímicas.

#### **6.5.4.1 Pruebas bioquímicas**

Para identificar a la gran cantidad de bacilos tanto positivos como negativos que se observaron en la identificación microscópica, así como un par de muestras con morfología de cocos, se realizaron varias pruebas bioquímicas para identificar a que género pertenecían las bacterias presentes en el área aséptica.

##### **6.5.4.1.1 Producción de hemolisinas**

La primera prueba realizada fue la hemólisis de la sangre. Se preparó el agar disolviendo 19.0 g de agar base sangre en 500 mL de agua destilada, calentándose a ebullición durante un minuto. Se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. El medio se enfrió hasta una temperatura de 40 °C para inmediatamente adicionarle con una pipeta estéril y en condiciones estériles 25 mL (5%) de sangre de carnero. Se homogenizó la sangre en el medio y se hizo el vaciado en cajas Petri estériles. El sembrado de las muestras en el agar sangre de carnero 5% se realizó por triple estría. El periodo de incubación fue de 24 horas a 37 °C.

##### **6.5.4.1.2 Crecimiento en Agar Mac Conkey**

Se suspendieron 41.250 g de agar Mac Conkey en 825 mL de agua destilada. Se llevó a ebullición por un minuto para una completa disolución del medio. Se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se enfrió hasta una temperatura de 40 °C aproximadamente y se fraccionó en cajas Petri previamente esterilizadas. Una vez que el agar solidificó, se sembró el inóculo por triple estría y se incubó a 37 °C por 24 horas.

##### **6.5.4.1.3 Prueba de movilidad en medio MIO**

Se disolvió 31 g del medio MIO en 100 mL de agua destilada, calentando hasta ebullición por un minuto para disolver completamente el medio deshidratado en el agua destilada. Después se distribuyó el medio en tubos de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón, esterilizándose a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos, dejándose enfriar en posición vertical. Se inoculó punzando el centro del medio a una profundidad de 1.25 cm aproximadamente y se incubó a 37 °C durante 48 horas.

#### **6.5.4.1.4 Prueba de la licuefacción de la gelatina**

Se disolvieron 1.28 g de caldo nutritivo seguidos de 19.20 g de gelatina bacteriológica en 160 mL de agua destilada, esperando unos minutos para que la mezcla se moje bien y se produjera una suspensión homogénea. Se llevó la mezcla a ebullición durante un minuto y se distribuyó en tubos de ensayo con tapón de baquelita (4 mL por cada tubo). Se esterilizó a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se inocularon los tubos punzando el medio hasta una profundidad de 1.25 cm aproximadamente y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Al momento de retirarlos de la incubación se metieron por unos minutos al refrigerador para poder hacer una lectura correcta de las muestras que presentaron la licuefacción del medio.

#### **6.5.4.1.5 Prueba de hidrólisis del almidón**

Se pesaron 26.4 g de agar bacteriológico seguido de 16.0 g de almidón soluble en 800 mL de agua destilada. Se calentó hasta disolución completa y se esterilizó a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. El agar se depositó en cajas Petri estériles aproximadamente 25 mL por cada caja. Una vez solidificado se realizó la inoculación por estría cerrada y se incubó por 24 horas a 37 °C. Antes de realizar la lectura se adicionó reactivo de Lugol, lo suficiente para cubrir la placa. Este reactivo evidenció las zonas de hidrólisis.

#### **6.5.4.1.6 Peptonización de la leche tornasolada**

Se pesaron 10 g de medio Litmus milk en 100 mL de agua destilada. Una vez que el medio se encontró completamente disuelto se distribuyó en tubos de ensayo de 13 x 100 con tapón de gasa y algodón. El proceso de esterilización consistió en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se realizó la inoculación por difusión y se incubó a 37 °C por un tiempo de 24 horas.

#### **6.5.4.1.7 Prueba de utilización de citrato**

Para la prueba de la utilización del citrato se empleó agar citrato de Simmons. Se pesaron 2.2 g los cuales se disolvieron en 100 mL de agua destilada calentando suavemente la solución. Se distribuyó en tubos de ensayo con tapón de gasa y algodón, alrededor de 3 mL por cada tubo. Se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se dejaron enfriar en posición inclinada para

formar el pico de flauta en los tubos. Se inocularon por medio de estría en el pico de flauta y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

#### **6.5.4.1.8 Prueba de reducción de nitratos a nitritos**

Se disolvió 0.9 g de caldo nitrato en 100 mL de agua destilada calentando suavemente y se fraccionó alrededor de 3 mL por cada tubo con tapón de gasa y algodón. La esterilización se realizó en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 lb. Se inocularon los tubos por difusión del inóculo y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Para realizar la prueba de la reducción de nitratos a nitritos se agregó a cada tubo 5 gotas de ácido acético 5 N, seguidas de 2 gotas de  $\alpha$ -naftilamina 0.5%, finalizando con 3 gotas de ácido sulfanílico, mezclando perfectamente. La lectura pudo realizarse después de un minuto.

#### **6.5.4.1.9 Prueba de Voges-Proskauer**

Para esta prueba se disolvió 1.7 g del medio deshidratado de RMVP en 100 mL de agua destilada y se homogenizó bien. Se distribuyó en tubos de 13 x 100 mm con tapón de gasa y algodón, esterilizándose a 121 °C a 15 lb de presión por 15 minutos y se dejó enfriar en posición vertical. Se inoculó por difusión e incubó a 37 °C por 24 horas. Para realizar la prueba se adicionó al medio incubado 0.2 mL de hidróxido de sodio al 40% y 0.6 mL de  $\alpha$ -naftol al 5%, mezclándolos perfectamente. La lectura final fue después de 15 minutos.

#### **6.5.4.1.10 Prueba de fermentación de hidratos de carbono**

Para la prueba se utilizó el medio Caldo rojo de fenol del cual se pesaron 5.25 g y se disolvieron en 350 mL de agua destilada. El hidrato de carbono empleado fue Dextrosa de la cual se pesaron 1.75 g y se adicionaron al medio. Se distribuyó 10 mL del medio en cada tubo y se les adicionó una campana de Durham. La esterilización se realizó en autoclave a 115 °C por un periodo de tiempo de 10 minutos. Se inocularon por difusión y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

#### **6.5.4.1.11 Prueba de Oxidación-Fermentación**

Se pesaron 3.43 g del medio basal OF (De Hugh y Leifson) en 350 mL de agua destilada. Se calentó con agitación constante hasta la disolución del medio. Por otra parte se preparó 3.5 mL de Dextrosa al 10%. Se mezclaron tanto el medio como la dextrosa y se esterilizaron a 115 °C por 10 minutos. Se mezcló y distribuyó asépticamente a razón de 5 mL por cada tubo de ensayo con tapa de baquelita. Para cada muestra se prepararon dos tubos; a uno de ellos se le adicionó aceite mineral estéril, aproximadamente 5 mm de grosor, el cual proporcionó condiciones anaerobias. Se inocularon todos los tubos por punción y se incubaron a 37 °C por 48 horas.

#### **6.5.4.1.12 Prueba de la catalasa**

Esta prueba se realizó en porta objetos. Lo primero que se llevó a cabo fue tomar una azada de la muestra en estudio y esparcirla al centro del porta objetos, después se le agregaron 3 gotas de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3.0%. La reacción fue positiva cuando inmediatamente después de agregar el peróxido de hidrógeno se presentaba burbujeo, aunque este fuese moderado.

#### **6.5.4.1.13 Prueba de la oxidasa**

En un pedazo de papel filtro colocado dentro de una caja Petri estéril, se agregaron de dos a tres gotas del reactivo de oxidasa, e inmediatamente se esparció un pequeño inóculo con un palito de madera estéril a través del papel humedecido previamente con el reactivo. La reacción positiva se indicó por la aparición de un color púrpura oscuro sobre el papel en un lapso de diez segundos.

## **7 RESULTADOS**

A continuación se muestran los resultados obtenidos del monitoreo ambiental de partículas totales (viables y no viables) presentes en el área aséptica de la planta piloto de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM antes y después de que la UMA fuera remplazada.

**TABLA 3.** Número y tamaño de partículas totales presentes en las diferentes secciones que integran el área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM antes del cambio de la UMA.

Tamaño ( $\mu$ )	VESTIDO 1		VESTIDO 2		PASILLO		FILTRACIÓN		RECEPCIÓN DE MATERIALES		LLENADO 1		LLENADO 2	
	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo
0.3	27669	31612	25819	29148	22828	25569	12416	14277	27036	30142	43756	49742	26535	29945
0.5	3426	3943	2986	3329	2481	2741	1593	1861	2766	3106	5274	5986	2980	3410
1.0	476	517	305	343	239	260	248	267	311	340	675	715	389	430
3.0	36	41	35	38	19	21	17	19	24	29	36	37	37	41
5.0	5	5	3	3	2	2	2	2	5	5	1	1	4	4
10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Diferencial=** Fracción de masa de la muestra total retenida en función de la abertura de malla.

**Acumulativo=** Análisis en el que se suman acumulativamente las masas de las fracciones individuales.

**TABLA 4.** Número y tamaño de partículas totales presentes en las diferentes secciones que integran el área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM después del cambio de la UMA.

Tamaño ( $\mu$ )	VESTIDO 1		VESTIDO 2		PASILLO		FILTRACIÓN		RECEPCIÓN DE MATERIALES		LLENADO 1		LLENADO 2	
	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo	Diferencial	Acumulativo
0.3	39942	45758	38572	43248	28195	32296	47771	54213	29795	33871	55438	63061	37630	42975
0.5	5264	5815	4296	4676	3628	4101	5800	6442	3603	4076	6684	7623	4690	5345
1.0	428	551	365	380	427	473	600	642	445	473	883	939	600	655
3.0	100	122	15	15	46	46	36	42	27	28	51	56	51	55
5.0	22	22	0	0	0	0	6	6	1	1	5	5	4	4
10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Diferencial=** Fracción de masa de la muestra total retenida en función de la abertura de malla.

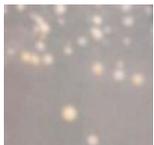
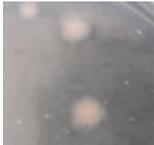
**Acumulativo=** Análisis en el que se suman acumulativamente las masas de las fracciones individuales.

Una vez concluida la etapa del monitoreo ambiental del área aséptica, se comenzó con la caracterización microbiana; esto llevado a cabo por la técnica de vaciado en placa. Pasado el periodo de incubación, se registró la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los aislamientos obtenidos de las diferentes secciones que conforman el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM se muestran de la tabla 5 a la 10.

**TABLA 5. Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica antes del cambio de la Unidad Manejadora de Aire.**

	VESTIDO 2 (TECHO)	VESTIDO 2 (PARED)	VESTIDO 2 (PISO)	VESTIDO 1 (PARED)	VESTIDO 1 (PISO)	LLENADO 2 (TECHO)	LLENADO 2 (PISO)
<b>CANTIDAD (UFC)</b>	> 50	5	7	> 50	> 50	37	> 50
<b>TAMAÑO (mm)</b>	1	9	32	1	1	1	1
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Circular	Circular	Irregular	Circular	Circular	Irregular	Circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Entero	Ondulado	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
<b>SUPERFICIE</b>	Brillante	Brillante	Lisa	Brillante	Brillante	Lisa	Lisa
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Opaca	Transparente	Opaca	Opaca	Opaca	Transparente
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Brillante	Brillante	Mate	Brillante	Brillante	Mate	Mate
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Beige	Amarillo	Beige	Beige	Beige	Blanca	Beige
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Cremosa	Seco	Cremosa	Cremosa	Seca	Cremosa
<b>IMAGEN</b>							

**TABLA 6. Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica antes del cambio de la Unidad Manejadora de Aire.**

	LLENADO 1 (TECHO)	LLENADO 1 (PISO)	FILTRADO (PARED)	RECEPCIÓN (TECHO)	RECEPCIÓN (PARED)	PASILLO (PARED)
<b>CANTIDAD (UFC)</b>	33	2	36	> 50	> 50	6
<b>TAMAÑO (mm)</b>	1	16	2	1	1	5
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Circular	Irregular	Irregular	Circular	Irregular	Circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Entero	Ondulado	Entero	Entero	Entero	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
<b>SUPERFICIE</b>	Lisa	Brillante	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Opaca	Opaca	Transparente	Transparente	Transparente
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Mate	Brillante	Mate	Mate	Mate	Mate
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige	Beige
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>IMAGEN</b>						

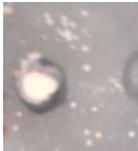
**TABLA 7. Unidades formadoras de colonias de hongos obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica antes del cambio de la Unidad Manejadora de Aire.**

	FILTRADO (SUELO)	RECEPCIÓN (TECHO)	LLENADO 1 (SUELO)	VESTIDO 1 (SUELO)
<b>CANTIDAD (UFC)</b>	3	1	2	1
<b>TAMAÑO</b>	30	26	80	43
<b>FORMA DE LA COLONIA</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>BORDE DE LA COLONIA</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>CONSISTENCIA</b>	Polvosa	Algodonosa	Polvosa	Algodonosa
<b>PIGMENTO SUPERIOR</b>	Verde con bordes blancos	Blanco	Verde con bordes blancos	Crema
<b>PIGMENTO INFERIOR</b>	beige	sin pigmento	café oscuro	naranja
<b>DIFUSIÓN HACIA EL MEDIO</b>	No	No	No	No
<b>IMAGEN</b>				

**TABLA 8. Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica después del cambio de la Unidad Manejadora de Aire.**

	FILTRADO (PISO)	LLENADO 1 (TECHO)	PASILLO (TECHO)	RECEPCIÓN (TECHO)	RECEPCIÓN (PARED)	RECEPCIÓN (PISO)	PASILLO (PARED)
<b>CANTIDAD (UFC)</b>	2	29	> 50	25	9	> 50	> 50
<b>TAMAÑO (mm)</b>	12	2	4	11	7	1	1
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Circular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Irregular	Irregular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Entero	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Ondulado	Ondulado
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana	Plana	Convexa	Plana	Convexa	Convexa	Convexa
<b>SUPERFICIE</b>	Lisa	Brillante	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Transparente	Opaca	Transparente	Opaca	Opaca	Opaca
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Mate	Brillante	Mate
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Beige	Beige	amarillo	Beige	Beige	Beige	Beige
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>IMAGEN</b>							

**TABLA 9. Unidades formadoras de colonias de bacterias obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica después del cambio de la Unidad Manejadora de Aire.**

	LLENADO 2 (PISO)	VESTIDO 2 (TECHO)	VESTIDO 2 (PARED)	VESTIDO 2 (PISO)	VESTIDO 1 (TECHO)	VESTIDO 1 (PARED)	VESTIDO 1 (PISO)
<b>CANTIDAD (UFC)</b>	> 50	> 50	39	> 50	39	> 50	> 50
<b>TAMAÑO (mm)</b>	1	15	1	11	1	1	1
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Irregular	Irregular	Circular	Irregular	Circular	Circular	Circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Ondulado	Ondulado	Entero	Ondulado	Entero	Entero	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana	Plana	Convexa	Plana	Convexa	Convexa	Convexa
<b>SUPERFICIE</b>	Lisa	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Transparente	Opaca	Transparente	Opaca	Opaca	Opaca
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Beige	Beige	amarillo	Beige	Beige	Beige	amarillo
<b>TEXTURA</b>	Seca/Dura	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>IMAGEN</b>							

**TABLA 10. Unidades formadoras de colonias de hongos obtenidas del monitoreo ambiental del área aséptica después del cambio de la Unidad Manejadora de Aire.**

	LLENADO 1 (PARED)	LLENADO 1 (TECHO)	PASILLO (PISO)
<b>CANTIDAD (UFC)</b>	2	2	12
<b>TAMAÑO</b>	19	38	34
<b>FORMA DE LA COLONIA</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>BORDE DE LA COLONIA</b>	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
<b>CONSISTENCIA</b>	Polvosa	Polvosa	Polvosa
<b>PIGMENTO SUPERIOR</b>	Verde grisáceo con bordes blancos	Verde grisáceo con bordes blancos	Verde grisáceo con bordes blancos
<b>PIGMENTO INFERIOR</b>	beige	beige	sin pigmento
<b>DIFUSIÓN HACIA EL MEDIO</b>	No	No	No
<b>IMAGEN</b>			

El total de muestras tomadas para identificar a los microorganismos presentes en el área aséptica fue de 21, tanto antes como después de que se reemplazara la UMA. De estas muestras se obtuvo el porcentaje de crecimiento tanto de bacterias como de hongos, obteniendo los siguientes resultados:

**TABLA 11.** Cantidad de muestras en las que se presentó crecimiento de microorganismos antes y después de la modificación de la Unidad Manejadora de Aire

	Antes de la modificación		Después de la modificación	
	Número de muestras con crecimiento	Porcentaje (%)	Número de muestras con crecimiento	Porcentaje (%)
<b>Bacterias</b>	13	61.90	14	66.67
<b>Hongos</b>	4	19.04	3	14.29

Para realizar la identificación de bacterias se tomó una muestra de cada colonia obtenida del monitoreo. Se aislaron y obtuvieron cepas puras, las cuales fueron caracterizadas. De la tabla 12 a la tabla 16 se muestra la caracterización macroscópica de las bacterias, mientras que de la tabla 17 a la 21 se muestra la información obtenida de cada colonia después de la caracterización microscópica.

**TABLA 12.** Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	PASILLO (TECHO I)	PASILLO (TECHO II)	PASILLO (TECHO III)	PASILLO (TECHO IV)	VESTIDO 2 (TECHO I)	VESTIDO 2 (TECHO II)	VESTIDO 2 (TECHO III)
<b>TAMAÑO (mm)</b>	8	17	2	2	18	4	1
<b>FORMA DE COLONIA</b>	irregular	irregular	circular	circular	irregular	circular	circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Ondulado	Ondulado	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Elevada	Plana	Elevada	Elevada	Plana	Elevada	Elevada
<b>SUPERFICIE</b>	Lisa/Brillante	Rugosa	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante	Brillante	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Transparente	Opaca	Opaca
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Mate	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Beige	Blanco hueso	Amarillo	Beige	Amarillo	Beige	Beige
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Seca	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>IMAGEN</b>							

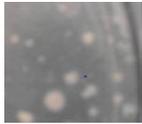
**TABLA 13.** Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	VESTIDO 1 (PISO I)	VESTIDO 1 (PISO II)	VESTIDO 1 (PISO III)	VESTIDO 1 (PISO IV)	VESTIDO 1 (PARED I)	LLENADO 2 (PISO I)	VESTIDO 2 (PISO I)
<b>TAMAÑO (mm)</b>	13	5	5	4	18	3	1
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Irregular	Circular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Ondulado	Entero	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
<b>SUPERFICIE</b>	Rugosa	Lisa/Brillante	Lisa	Brillante	Brillante	Rugosa	Brillante
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Tranparente	Opaca	Tranparente	Opaca	Opaca	Opaca
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Mate	Brillante	Mate	Brillante	Mate	Mate	Brillante
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Blanca	Amarilla	Beige	Amarilla	Blanca/Beige	Beige	Amarillo
<b>TEXTURA</b>	Seca/Dura	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Seca	Cremosa
<b>IMAGEN</b>							

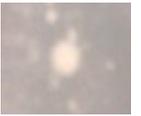
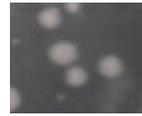
**TABLA 14.** Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	VESTIDO 2 (PISO II)	RECEPCIÓN (PARED I)	RECEPCIÓN (PARED II)	RECEPCIÓN (PARED III)	RECEPCIÓN (PISO I)	RECEPCIÓN (PISO II)	RECEPCIÓN (PISO III)
<b>TAMAÑO (mm)</b>	10	27	14	10	14	3	4
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Circular	Circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Entero	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado (poco)	Entero	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Elevado (poco)	Plana	Plana	Plana	Plana	Elevada	Elevada
<b>SUPERFICIE</b>	Radial/ Concéntrica	Brillante	Brillante	Brillante	Lisa/Radial	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Transparente	Transparente	Transparente	Opaca	Opaca	Opaca
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Mate	Brillante	Brillante
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Beige	Amarilla	Amarilla	Beige	Blanca	Beige	beige
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>IMAGEN</b>							

**TABLA 15.** Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	VESTIDO 2 (TECHO IV)	VESTIDO 2 (TECHO V)	VESTIDO 2 (PARED I)	VESTIDO 2 (PARED II)	VESTIDO 2 (PARED III)	VESTIDO 2 (PARED IV)	VESTIDO 1 (TECHO I)
<b>TAMAÑO (mm)</b>	4	11	9	14	4	3	3
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Circular	Irregular	Circular	Irregular	Circular	Circular	Circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Entero	Ondulado	Entero	Ondulado	Entero	Entero	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Elevada	Plana	Plana	Plana	Elevada	Elevada	Elevada
<b>SUPERFICIE</b>	Lisa/Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante	Lisa/Brillante
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Opaca	Transparente	Opaca	Transparente	Opaca	Opaca	Opaca
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Brillante	Brillante	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Beige	Amarillo	Beige	Amarillo	Beige	Beige	Amarillo
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>IMAGEN</b>							

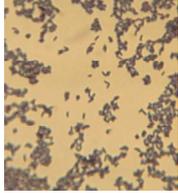
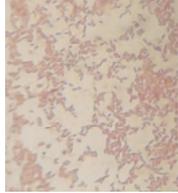
**TABLA 16.** Morfología macroscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	RECEPCIÓN (PISO IV)	LLENADO 1 (TECHO I)	FILTRADO (PISO I)	FILTRADO (PISO II)	PASILLO (PARED I)	RECEPCIÓN (TECHO I)	RECEPCIÓN (TECHO II)	RECEPCIÓN (TECHO III)
<b>TAMAÑO (mm)</b>	10	4	13	6	2	3	1	4
<b>FORMA DE COLONIA</b>	Irregular	Circular	Irregular	Irregular	Circular	Circular	Circular	Circular
<b>BORDE DE COLONIA</b>	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Entero	Entero	Entero
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
<b>SUPERFICIE</b>	Brillante	Lisa	Radial/ Concéntrica	Rugosa	Lisa	Brillante	Lisa	Lisa
<b>LUZ TRANSMITIDA</b>	Transparente	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Transparente	Opaca	Opaca
<b>LUZ REFLEJADA</b>	Mate	Brillante	Mate	Mate	Mate	Brillante	Brillante	Brillante
<b>COLOR DE COLONIA</b>	Amarilla	Blanca	Blanca	Beige	Beige	Amarilla	Beige	Beige
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Seca	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>IMAGEN</b>								

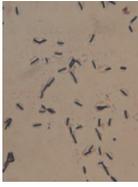
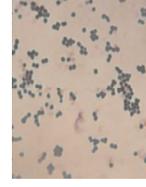
**TABLA 17.** Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	VESTIDO 2 (TECHO IV)	VESTIDO 2 (TECHO V)	VESTIDO 2 (PARED I)	VESTIDO 2 (PARED II)	VESTIDO 2 (PARED III)	VESTIDO 2 (PARED IV)	PASILLO (PARED I)
<b>FORMA</b>	Bacilos cortos y pequeños	Bacilos cortos, pequeños y delgados	Bacilos gruesos, largos. Esporas sueltas	Bacilos pequeños. Algunas cadenas pequeñas	Bacilos pequeños y delgados, algunos presentan agrupación en palizadas	Bacilos cortos	Bacilos más pequeños. Esporulados (terminales y centrados)
<b>GRAM</b>	-	-	+	-	+	+	+
<b>AGRUPACIÓN</b>	Cadenas	Cadenas	Cadenas	Células individuales	Cadenas cortas	Forma de palizadas	Cadenas cortas
<b>IMAGEN</b>							

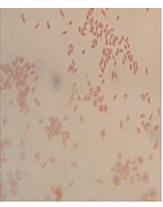
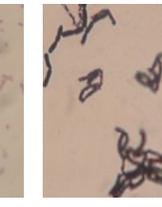
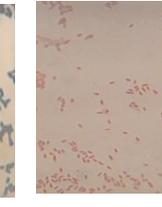
**TABLA 18.** Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	PASILLO (TECHO I)	PASILLO (TECHO II)	PASILLO (TECHO III)	PASILLO (TECHO IV)	VESTIDO 2 (TECHO I)	VESTIDO 2 (TECHO II)	VESTIDO 2 (TECHO III)
<b>FORMA</b>	Bacilos gruesos y largos	Bacilos más pequeños. Esporulados (terminales y centrados)	Cocobacilos	Bacilos Esporulados céntricos y terminales. Forma de puros	Bacilos pequeños, delgados, cortos	Bacilos cortos, delgados	Cocobacilos delgados
<b>GRAM</b>	+	+	-	+	-	+	-
<b>AGRUPACIÓN</b>	Cadenas	Células individuales	Cadenas pequeñas	Cadenas	Células individuales	Empalizada	Células individuales
<b>IMAGEN</b>							

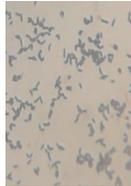
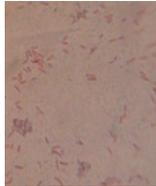
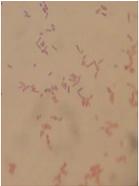
**TABLA 19.** Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

	VESTIDO 1 (PISO I)	VESTIDO 1 (PISO II)	VESTIDO 1 (PISO III)	VESTIDO 1 (PISO IV)	VESTIDO 1 (PARED I)	VESTIDO 1 (PISO II)	VESTIDO 2 (PISO I)
<b>FORMA</b>	Bacilos esporulados. Esporas céntricas	Bacilos largos y delgados	Bacilos rectos, delgados y largos	Bacilos rectos, delgados y cortos	Cocos pequeños	Bacilos largos y delgados. Esporas sueltas	Bacilos largos y delgados
<b>GRAM</b>	+	+	+	-	+	+	-
<b>AGRUPACIÓN</b>	Cadenas pequeñas. Algunas células individuales.	Cadenas largas	Cadenas largas	Cadenas	Racimos pequeños. Algunas células independientes	Células individuales	Células individuales
<b>IMAGEN</b>							

**TABLA 20.** Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

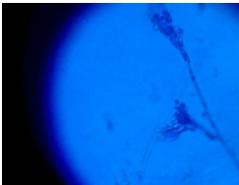
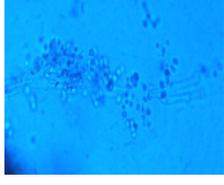
	VESTIDO 2 (PISO II)	RECEPCIÓN (PARED I)	RECEPCIÓN (PARED II)	RECEPCIÓN (PARED III)	RECEPCIÓN (PISO I)	RECEPCIÓN (PISO II)	RECEPCIÓN (PISO III)
<b>FORMA</b>	Bacilos pequeños, delgados y rectos	Cocobacilos muy pequeños y delgados	Bacilos cortos, pequeños y delgados	Bacilos gruesos y largos	Bacilos gruesos	Bacilos pequeños	Bacilos pequeños
<b>GRAM</b>	-	-	-	-	+	+	-
<b>AGRUPACIÓN</b>	Células individuales	Células individuales	Células individuales	Cadena	Cadenas largas	Cadenas pequeñas	Cadenas pequeñas
<b>IMAGEN</b>							

**TABLA 21.** Morfología microscópica de bacterias presentes en el área aséptica de la FES Zaragoza UNAM

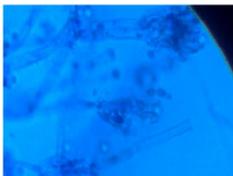
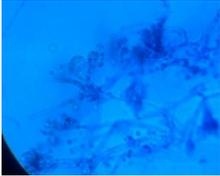
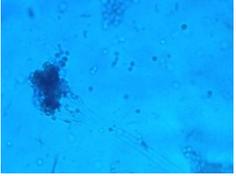
	RECEPCIÓN (PISO IV)	LLENADO 1 (TECHO I)	FILTRADO (PISO I)	FILTRADO (PISO II)	LLENADO 2 (PISO I)	RECEPCIÓN (TECHO I)	RECEPCIÓN (TECHO II)	RECEPCIÓN (TECHO III)
<b>FORMA</b>	Bacilos pequeños	Cocos	Bacilos gruesos y largos	Bacilos esporulados. Esporas céntricas	Bacilos cortos y delgados	Bacilos cortos, pequeños y delgados	Bacilos cortos, pequeños y delgados	Bacilos cortos, pequeños y delgados
<b>GRAM</b>	-	+	-	+	+	-	-	-
<b>AGRUPACIÓN</b>	Células independientes	Racimos y células individuales	Cadenas	Células individuales	Empalizada	Células individuales	Células individuales	Células individuales
<b>IMAGEN</b>								

Para la identificación de los hongos aislados del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM se analizaron las características macro y microscópicas de cada colonia, obteniendo así la clasificación de género de cada uno de ellos. Las tablas 22 y 23 muestran a los hongos presentes antes y después de la modificación de la UMA de la planta piloto farmacéutica respectivamente, mientras que la tabla 24 muestra el género y porcentaje de los hongos presentes en el área.

**TABLA 22.** Caracterización e identificación del género de cada hongo aislado de la planta piloto farmacéutica antes del cambio de la UMA

	FILTRACIÓN (SUELO)	RECEPCION DE MATERIAL (TECHO)	LLENADO 1 (SUELO)	VESTIDO 1 (SUELO)
<b>CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS</b>	La colonia fue al principio blanca, pero después tomó un color verde y aspecto muy polvoriento debido a la abundante producción de esporas a partir del micelio aéreo.	Este hongo filamentososo presentó una consistencia algodonosa y coloración blanca a los pocos días de crecimiento.	La colonia presentó una consistencia polvorienta. Inicialmente fue de color blanco pero después de unos días adquirió una coloración amarillo-marrón. El reverso de la colonia presentó pigmentación marrón.	Presento crecimiento rápido, adquiriendo una pigmentación color amarillo-marrón. La colonia fue plana y de consistencia polvorienta presentando al reverso una coloración marrón.
<b>CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS</b>	Las hifas portadoras de las esporas forman el "pincel" o cepillo característico. Presenta conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas. Los conidios se observan en cadenas no ramificadas, de forma esférica, hialinas y de pared delgada.	Los conidios se observan agrupados en una estructura característica en forma de pincel. Presenta conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas.	Se observaron conidióforos de ramificación irregular, fialides individuales. Los conidios presentaron ligera pigmentación, hialinos, de forma elíptica y de pared lisa, agrupados en cadenas largas.	Se observaron conidióforos de ramificación irregular, fialides individuales. Los conidios presentaron ligera pigmentación, hialinos, de forma elíptica y de pared lisa, agrupados en cadenas largas.
<b>IMAGEN</b>	 	 	 	 
<b>GÉNERO</b>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Paecilomyces</i>

**TABLA 23.** Caracterización e identificación del género de cada hongo aislado de la planta piloto farmacéutica después del cambio de la UMA

	LLENADO 1 (PARED)	LLENADO 1 (TECHO)	PASILLO (PISO)
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	En un inicio la colonia presentó una coloración blanca; tiempo después tomó un color verde y consistencia polvorienta debido a la abundante producción de esporas a partir del micelio aéreo.	La colonia presentó un rápido crecimiento, fue plana, filamentososa y de consistencia polvosa adquiriendo una pigmentación verde grisácea.	La colonia presentó un crecimiento rápido, plana, filamentososa, al principio blanco, pero después tomó un color verde y consistencia muy polvorienta.
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	Las hifas portadoras de las esporas forman el cepillo característico de este género. Presenta conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas. Los conidios se observan en cadenas no ramificadas, de forma esférica, hialinas y de pared delgada.	Se observaron hifas hialinas septadas. La organización de los fialides en las puntas de los conidióforos es muy típica. Observándose agrupaciones similares a un cepillo.	Los conidios se observan agrupados en una estructura característica en forma de pincel. Presenta conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas.
IMAGEN	 	 	 
GÉNERO	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>

**TABLA 24.** Género y porcentaje de hongos aislados del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

HONGOS		
Género	Número de muestras	Porcentaje (%) <sup>a</sup>
<i>Penicillium</i>	5	71.43
<i>Paecilomyces</i>	2	28.57

**a=** El total de hongos es de siete muestras

El último paso para la identificación de las muestras de bacterias presentes en el área aséptica fue la realización de un conjunto de pruebas bioquímicas, las cuales se muestran de la tabla 25 a la tabla 33. Poner a prueba las actividades enzimáticas de las diferentes cepas bacterianas proporcionó información necesaria para identificar el género al que pertenecen.

**TABLA 25.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	PASILLO (TECHO III)	VESTIDO 2 (TECHO I)	VESTIDO 2 (TECHO III)	VESTIDO 2 (TECHO IV)	VESTIDO 2 (TECHO V)
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	-	+	-	+	+
HEMÓLISIS DE SANGRE	$\beta$	$\beta$	$\gamma$	$\beta$	$\beta$
MOVILIDAD	-	-	-	-	-
LICUEFACCIÓN DE GELATINA	-	+	-	+	+
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	-	+	-	-	+
CATALASA	+	+	+	+	+
OXIDASA	+	+	+	-	+
PEPTONIZACIÓN DE LECHE	-	+	-	-	-
UTILIZACIÓN DE CITRATO	-	+	-	+	+
REDUCCIÓN DE NITRATO	-	+	-	-	+
REACCIÓN VOGES-PROSKAUER	+	+	+	+	+
ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA	-	-	-	-	-
OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)	NF	O	NF	O	O
GÉNERO	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Moraxella</i>

$\beta$ = Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

$\gamma$ = El microorganismo en cuestión no es capaz de realizar la hemólisis. No existe halo alrededor de la colonia

**NF**= Crecimiento sin fermentación

**O**= Crecimiento con oxidación

**+**= Reacción positiva

**-**= Reacción negativa

**TABLA 26.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	VESTIDO 2 (PARED II)	VESTIDO 1 (PISO IV)	VESTIDO 2 (PISO I)	VESTIDO 2 (PISO II)	RECEPCIÓN (PARED I)
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	+	+	-	-	+
HEMÓLISIS DE SANGRE	β	β	β	β	γ
MOVILIDAD	+	-	+	+	-
LICUEFACCIÓN DE GELATINA	+	+	+	+	-
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	+	-	+	+	+
CATALASA	+	+	+	+	+
OXIDASA	+	-	+	+	+
PEPTONIZACIÓN DE LECHE	+	-	+	+	-
UTILIZACIÓN DE CITRATO	+	+	+	+	+
REDUCCIÓN DE NITRATO	+	-	+	+	-
REACCIÓN VOGES-PROSKAUER	+	+	+	+	+
ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA	+	-	+	+	-
OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)	O	O	O	O	NF
GÉNERO	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Moraxella</i>

β= Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

γ= El microorganismo en cuestión no es capaz de realizar la hemólisis. No existe halo alrededor de la colonia

**NF**= Crecimiento sin fermentación

**O**= Crecimiento con oxidación

**+**= Reacción positiva

**-**= Reacción negativa

**TABLA 27.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	RECEPCIÓN (PARED II)	RECEPCIÓN (PARED III)	RECEPCIÓN (PISO III)	RECEPCIÓN (PISO IV)	FILTRADO (PISO I)
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	+	+	-	+	-
HEMÓLISIS DE SANGRE	$\gamma$	$\beta$	$\gamma$	$\beta$	$\beta$
MOVILIDAD	-	+	-	+	+
LICUEFACCIÓN DE GELATINA	-	+	+	+	+
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	+	+	-	+	-
CATALASA	+	+	+	+	+
OXIDASA	+	+	-	+	-
PEPTONIZACIÓN DE LECHE	-	+	+	+	-
UTILIZACIÓN DE CITRATO	+	+	-	+	-
REDUCCIÓN DE NITRATO	-	+	-	+	-
REACCIÓN VOGES-PROSKAUER	+	+	+	+	+
ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA	-	+	-	+	+
OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)	NF	O	NF	O	NF
GÉNERO	<i>Moraxella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>

$\beta$ = Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

$\gamma$ = El microorganismo en cuestión no es capaz de realizar la hemólisis. No existe halo alrededor de la colonia

**NF**= Crecimiento sin fermentación

**O**= Crecimiento con oxidación

**+**= Reacción positiva

**-**= Reacción negativa

**TABLA 28.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	<b>RECEPCIÓN (TECHO I)</b>	<b>RECEPCIÓN (TECHO II)</b>	<b>RECEPCIÓN (TECHO III)</b>
<b>CRECIMIENTO EN MAC CONKEY</b>	+	+	-
<b>HEMÓLISIS DE SANGRE</b>	β	β	β
<b>MOVILIDAD</b>	-	-	-
<b>LICUEFACCIÓN DE GELATINA</b>	+	+	+
<b>HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN</b>	+	+	-
<b>CATALASA</b>	+	+	+
<b>OXIDASA</b>	+	+	-
<b>PEPTONIZACIÓN DE LECHE</b>	+	+	+
<b>UTILIZACIÓN DE CITRATO</b>	+	+	+
<b>REDUCCIÓN DE NITRATO</b>	+	+	+
<b>REACCIÓN VOGES-PROSKAUER</b>	+	+	+
<b>ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA</b>	-	-	+
<b>OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)</b>	O	O	O
<b>GÉNERO</b>	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>

β= Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

O= Crecimiento con oxidación

+ = Reacción positiva

- = Reacción negativa

**TABLA 29.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	PASILLO (TECHO I)	PASILLO (TECHO II)	PASILLO (TECHO IV)	VESTIDO 2 (TECHO II)	VESTIDO 2 (PARED I)
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	-	-	-	-	-
HEMÓLISIS DE SANGRE	$\alpha$	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\beta$
MOVILIDAD	-	+	+	-	-
LICUEFACCIÓN DE GELATINA	+	+	+	+	+
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	+	+	-	+	+
CATALASA	+	+	+	+	+
OXIDASA	+	+	-	-	+
PEPTONIZACIÓN DE LECHE	-	+	+	+	-
UTILIZACIÓN DE CITRATO	-	+	+	-	+
REDUCCIÓN DE NITRATO	-	+	+	-	-
REACCIÓN VOGES-PROSKAUER	+	+	+	+	-
ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA	-	+	-	-	-
OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)	NF	O	O	O	NF
GÉNERO	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>

$\alpha$ = Hemólisis parcial. La zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verde

$\beta$ = Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

**NF**= Crecimiento sin fermentación

**O**= Crecimiento con oxidación

**+**= Reacción positiva

**-**= Reacción negativa

**TABLA 30.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	VESTIDO 2 (PARED III)	VESTIDO 2 (PARED IV)	VESTIDO 1 (PISO I)	VESTIDO 1 (PISO II)	VESTIDO 1 (PISO III)
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	-	-	-	-	-
HEMÓLISIS DE SANGRE	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
MOVILIDAD	-	+	+	-	-
LICUEFACCIÓN DE GELATINA	+	+	+	+	+
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	+	+	+	-	+
CATALASA	+	+	+	+	+
OXIDASA	-	-	+	-	+
PEPTONIZACIÓN DE LECHE	-	+	+	+	-
UTILIZACIÓN DE CITRATO	-	-	+	+	-
REDUCCIÓN DE NITRATO	-	-	+	+	-
REACCIÓN VOGES-PROSKAUER	+	+	+	-	-
ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA	+	-	+	+	-
OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)	NF	O	O	O	NF
GÉNERO	<i>Corynebacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Bacillus</i>

$\alpha$ = Hemólisis parcial. La zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verde

$\beta$ = Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

**NF**= Crecimiento sin fermentación

**O**= Crecimiento con oxidación

**+**= Reacción positiva

**-**= Reacción negativa

**TABLA 31.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	VESTIDO 1 (PARED I)	PASILLO (PARED I)	RECEPCIÓN (PISO I)	RECEPCIÓN (PISO II)	LLENADO 1 (TECHO I)
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	-	-	-	-	-
HEMÓLISIS DE SANGRE	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\alpha$
MOVILIDAD	-	-	-	-	-
LICUEFACCIÓN DE GELATINA	+	+	+	+	+
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	-	-	-	-	-
CATALASA	+	+	+	+	+
OXIDASA	-	+	+	+	-
PEPTONIZACIÓN DE LECHE	-	+	+	+	+
UTILIZACIÓN DE CITRATO	+	+	-	-	-
REDUCCIÓN DE NITRATO	+	+	+	+	+
REACCIÓN VOGES- PROSKAUER	-	-	+	+	-
ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA	+	+	+	+	+
OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)	O	NF	NF	NF	F
GÉNERO	<i>Micrococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>

$\alpha$ = Hemólisis parcial. La zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verde

$\beta$ = Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

**NF**= Crecimiento sin fermentación

**F**= Crecimiento con fermentación

**O**= Crecimiento con oxidación

**+**= Reacción positiva

**-**= Reacción negativa

**TABLA 32.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas del área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	FILTRADO (PISO II)	LLENADO 2 (PISO I)
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	-	-
HEMÓLISIS DE SANGRE	$\alpha$	$\beta$
MOVILIDAD	+	+
LICUEFACCIÓN DE GELATINA	+	+
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	+	+
CATALASA	+	+
OXIDASA	+	+
PEPTONIZACIÓN DE LECHE	+	+
UTILIZACIÓN DE CITRATO	+	+
REDUCCIÓN DE NITRATO	+	+
REACCIÓN VOGES- PROSKAUER	+	+
ÁCIDO A PARTIR DE DEXTROSA	+	+
OXIDACIÓN/REDUCCIÓN (OF)	F	F
<b>GÉNERO</b>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>

$\alpha$ = Hemólisis parcial. La zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verde

$\beta$ = Hemólisis total. El halo que rodea a las colonias es totalmente transparente

F= Crecimiento con fermentación

+ = Reacción positiva

- = Reacción negativa

**TABLA 33.** Género y porcentaje de las bacterias identificadas en el área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la FES Zaragoza UNAM

Bacterias Gram positivas			Bacterias Gram negativas		
Género	Número de muestras	Porcentaje (%) <sup>a</sup>	Género	Número de muestras	Porcentaje (%) <sup>a</sup>
<i>Bacillus</i>	13	37.14	<i>Moraxella</i>	8	22.86
<i>Micrococcus</i>	2	5.71	<i>Pseudomonas</i>	6	17.14
<i>Corynebacterium</i>	1	2.86	<i>Acinetobacter</i>	4	11.43
<i>Staphylococcus</i>	1	2.86			

a= El número total de bacterias aisladas del área aséptica fue de 35

## 7 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Mientras se llevaba a cabo la primera limpieza y monitoreo de las diferentes secciones comprendidas en el área aséptica (Filtrado, Recepción de materiales, Llenado 1, Llenado 2, Pasillo, Vestido 1 y Vestido 2) se realizaron modificaciones a la Unidad Manejadora de Aire, debido a problemas operativos. En un inicio se tenía planeado realizar la identificación de la carga microbiana en condiciones normales de trabajo, pero debido a la falla en la UMA se modificó el plan de trabajo planteado, tomando un nuevo parámetro a evaluar: el análisis de la cantidad de partículas antes y después del cambio en la UMA. Las tablas 3 y 4 muestran claramente el cambio en el contenido de partículas totales después de la modificación.

Dentro del área aséptica como se observa en el diagrama 1 al realizar una evaluación preliminar se observó que fue la sección de Vestido 1, dentro de las áreas críticas para llevar a cabo el proceso de filtración por membrana, donde la cantidad de partículas totales fue mayor, esto debido a que es el cuarto de ingreso al área estéril; es aquí donde el personal que se dispone a trabajar en el área se cambia su vestimenta ordinaria por el uniforme aséptico, ingresando de esta manera partículas contaminantes al área. En cuanto a infraestructura, el cuarto de Vestido 1 presenta partes en el techo que no corresponden a un acabado aséptico, resultado áspero, lo que posiblemente genera una mayor acumulación de suciedad. Otro factor que aumenta la cantidad de partículas es la poca hermeticidad que proporciona la puerta entre Vestido 1 y el área de servicios. Cabe señalar que las áreas que comprenden el área aséptica no han sido modificadas durante más de tres años. <sup>(2)</sup>

El cuarto de Filtración, antes de la modificación de la UMA, fue la sección del área aséptica que presentó una menor carga de partículas con un tamaño de  $0.5\mu$  (1,861 partículas), lo cual lo sitúa en la clasificación ISO-clase 5, llenado aséptico, operaciones asépticas ( $0.5\mu \leq 3,520$  por  $m^3$ ) al igual que la sección de Vestido 2, Pasillo, Recepción de materiales y Llenado 2 como se observa en la tabla 3. <sup>(5)</sup>

La sección del área aséptica que presentó mayor carga de partículas totales no fue el cuarto de Vestido 1 (3,943 partículas con tamaño de  $0.5\mu$ ) como se supondría por ser este el cuarto de ingreso del personal del área de servicios al área aséptica. El cuarto que presentó la carga de partículas totales mayor fue el cuarto de Llenado 1 (5,986 partículas con tamaño de  $0.5\mu$ ), esto debido a la gran cantidad de grietas que presenta el cuarto, pero lo que fue determinante para obtener este resultado fue la presencia de una selladora que no se utiliza y solo genera un lugar donde se acumulan las partículas tanto viables como no viables.

Esta cantidad de partículas llevó a considerar al cuarto de Llenado 1 dentro de la clasificación ISO-clase 6 ( $0.5 \mu \leq 3, 520,000$  por  $m^3$ ) Entorno de ISO-clase 5 para productos que no llevan esterilización terminal. Cuartos vestidores para áreas ISO-clase 5, al igual que el cuarto de Vestido 1.

Otro factor observado fue la velocidad del flujo de aire; esta no fue la misma para todos los cuartos. En algunos, como en el caso de Llenado 1, la velocidad de inyección de aire por parte de la UMA fue mayor, lo que generó un mayor número de partículas provenientes del aire que ingresaba al cuarto y, por otro lado, el mismo aire resuspendió las partículas viables y no viables alojadas en la superficie de la selladora.

Una vez realizado el cambio de motor de la UMA se volvió a llevar a cabo el conteo de partículas totales y lo que se constató fue un aumento de partículas generalizado en los cuartos del área, pero donde se observó un aumento mucho mayor al de otro cuarto fue en el de Filtración (6442 partículas con tamaño de  $0.5\mu$ ), esto debido al notorio aumento en la velocidad del flujo de aire que ingresaba al área aséptica. Fue en este cuarto que se notó el mayor cambio de velocidad y de cantidad de aire que ingresaba; antes de la modificación el aire que entraba era muy poco; mientras se realizó la limpieza y se limpió la entrada de aire se pudo constatar el cambio. Esto resulta un gran inconveniente para los procesos asépticos que ahí se realizan.

Después de la modificación de la UMA todas las áreas salieron de los parámetros permitidos para considerarlas ISO-clase 5 ( $0.5 \mu \leq 3,520$  por  $m^3$ ) considerándose ahora dentro de la clasificación para áreas de entorno ISO-clase 6 ( $0.5 \mu \leq 3, 520,000$  por  $m^3$ ) para productos que no llevan esterilización terminal. Excluidas a cuartos de llenado, como se observa en la tabla 4. <sup>(5)</sup>

En cuanto a lo que señala la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013 en su Apéndice normativo A para áreas de fabricación clasificadas como ISO-clase 5 (llenado aséptico): para partículas viables, la cantidad de UFC deben de ser  $\leq 1/m^3$  y  $\leq 1/placa$ , y para las áreas ISO-clase 6 (entorno de ISO-clase 5 para productos que no llevan esterilización terminal) la cantidad de UFC debe ser  $\leq 10/m^3$  y  $\leq 5/placa$ . Por lo que se observa en las tablas 5 a 10 este criterio no se cumplió en ninguno de los muestreos; en todos los cuartos del área aséptica se obtuvo más de 10 UFC/placa. <sup>(5)</sup>

Estos resultados son atribuibles al sistema de aire, el cual, a pesar de haberse reemplazado el motor, no cuenta con filtros terminales, un sistema de extracción de aire y algún sistema de alarmas en caso de perder las condiciones adecuadas del flujo de aire, además de que sería adecuado evaluar las condiciones en las

que se encuentra el filtro HEPA con el que cuenta actualmente. Las presiones diferenciales con las que debería de operar el área aséptica no se logran. La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013 establece que el sistema de aire debe de controlarse de tal manera que cumpla con los parámetros de su diseño y genere una presión positiva, lo cual no se logra ya que hay puertas como la de Recepción de materiales que no cierra bien; incluso siempre se termina abriendo y también la puerta que conecta el Pasillo con el cuarto de Vestido 2 presenta una dificultad para cerrarse. Aunado a esto, están las condiciones de la infraestructura: en todos los cuartos se observaron cuarteaduras tanto en techo, paredes o piso, incluso en el cuarto de Vestido 1 se observa cómo se intentó subsanar estos problemas, sin embargo, se complicaron, ya que en el techo se observa alrededor de la lámpara como se resanó; este arreglo ocasionó un parte del techo rugosa lo cual puede ser motivo de acumulación de partículas viables y no viables. <sup>(5)</sup>

En todas las secciones del área aséptica se presentó crecimiento de microorganismos; siendo el cuarto de Vestido 2 el lugar donde la carga microbiana fue mayor, seguido del cuarto de Recepción de material. A pesar de que en estas áreas no se registrara la mayor carga de partículas totales como es el caso del cuarto de filtrado, si fueron las que tuvieron mayor crecimiento de microorganismos.

El género de bacterias que se presentó en mayor proporción fue *Bacillus* (34.29 %); perteneciente a la familia *Bacillaceae*. Este tipo de microorganismos presentan la característica forma bacilar y la capacidad de formar endosporas, lo cual le confiere la habilidad de resistir largos periodos en condiciones ambientales adversas en estado de latencia, por lo que pueden subsistir fácilmente en el suelo o como partículas de polvo en suspensión. Al momento de presentarse las condiciones adecuadas de alimentación y crecimiento las esporas germinan, sobreviniendo una rápida multiplicación, tal como se constató al momento de realizar el conteo de UFC de cada sección del área. <sup>(33)</sup>

El segundo género de bacterias con mayor presencia fue *Moraxella* (22.86 %). Este tipo de bacterias forma parte de la flora normal de las vías respiratorias superiores del hombre, su localización es extracelular y en raras excepciones producen enfermedad (patógenos oportunistas). Son poco exigentes y no necesitan de medios enriquecidos, además de que pueden crecer a 22 °C y son poco sensibles a los agentes externos. Por estas características la bacteria formó parte de la contaminación del área, siendo los alumnos los portadores de la bacteria, que posiblemente al estornudar o toser liberaron a las bacterias en el área. <sup>(34)</sup>

Otro género de bacteria contaminante del área aséptica fue *Pseudomonas* (17.14 %). Estas bacterias permanecen durante largos períodos de tiempo en líquidos y superficies (jabones, esponjas, bañeras, fregaderos, termómetros orales, equipos inhalatorios, líquidos de diálisis, grifos de agua, ropa, entre muchos otros), también se encuentran en menor proporción como parte de la microflora humana de individuos sanos (axilas, tracto respiratorio, faringe y en las heces). La presencia de equipos inutilizables, como el caso de la selladora en el cuarto de Llenado 1 o el lavabo en el área de Vestido 2 son factores que conllevaron a una alta presencia de éste, como los demás géneros bacterianos muestreados. <sup>(35)</sup>

*Micrococcus* (5.71 %) y *Staphylococcus* (2.86 %) fueron dos géneros bacterianos que también fueron aislados del área aséptica. Estas bacterias, además de encontrarse en ambientes como agua y suelo, así como productos alimenticios, también pueden ser aisladas de la piel de personas sanas. Las especies de estos géneros pueden crecer bien en ambientes con poca agua o con altas concentraciones de sal. <sup>(36)</sup>

Aunque no forman esporas, las células de *Micrococcus* pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo. Características por las que la bacteria pudo haber ingresado al área (al momento de que el usuario comenzó a trabajar en ella o tiempo atrás por otros usuarios o el sistema de aire) y se mantuvo en estado latente hasta proporcionarle los nutrientes necesarios para su crecimiento. <sup>(37)</sup>

El género *Corynebacterium* (2.86 %) está ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en el suelo, el agua, productos alimenticios y también en la mucosa y piel del hombre y animales. Muchas especies de *Corynebacterium* habitan en la piel de todos los seres humanos, especialmente en la zona axilar. La contaminación del área con este tipo de bacterias, así como las del género *Micrococcus* y *Staphylococcus* pudo ser provocada por el mismo usuario y también por el aire que ingresa al área, pero su baja incidencia se debió a la utilización del traje estéril para área aséptica. <sup>(33)</sup>

Encontrar la presencia de bacterias del género *Acinetobacter* (11.43 %) en el monitoreo ambiental de la planta piloto farmacéutica se debió a que este tipo de bacterias tiene requerimientos de crecimientos muy simples y llegan a utilizar una gran cantidad de fuentes de carbono a través de diversas vías metabólicas. Por estas características pueden ser aisladas de múltiples medios tanto animados como inanimados, como es el caso de material hospitalario y en sistemas de ventilación, como es el caso de la Unidad Manejadora de Aire con la que cuenta el área aséptica. <sup>(38)</sup>

Con relación a los hongos presentes en el área aséptica fue el género *Penicillium* (71.43 %) el cual se presentó en mayor proporción y esto debido a que este tipo de hongos se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza: en el suelo, la vegetación, el aire y el suelo, siendo comúnmente el género de hongo más abundante en suelos y considerado un contaminante habitual de laboratorio. Al igual que *Paecilomyces* (28.57 %) el medio de entrada para contaminar el área aséptica fue el sistema de aire y es que resulta muy fácil para las esporas de los hongos transportarse por el viento y mantenerse en zonas cerradas como es el caso del área. <sup>(39)</sup>

## 8 CONCLUSIONES

El área aséptica de la planta piloto farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM no cumple con las especificaciones que determina la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013 en su Apéndice normativo A para áreas de fabricación farmacéutica clasificación ISO-clase 5 (Llenado aséptico) ya que la cantidad de partículas viables y no viables presentes en el área superan lo permitido. Fue después de que se arregló la UMA cuando incrementó de manera generalizada la cantidad de partículas totales en las secciones, impactando en mayor medida al cuarto de Filtración, sin embargo, cabe señalar que el área cuenta con secciones separadas e identificadas para realizar cada una de las actividades asépticas que se requieren, siendo un espacio adecuado para la docencia. Su diseño de construcción muestra un panorama general y permite que los alumnos de la carrera de Química Farmacéutico Biológico trabajen en un escenario real de la industria farmacéutica.

Se determinó la calidad microbiológica con la que actualmente opera el área aséptica; identificar a los microorganismos presentes, hace posible indagar sobre su posible origen y tomar las medidas necesarias para evitar el ingreso de estos a las instalaciones, así como implementar un rol de sanitizantes específico que ayude, junto con el mantenimiento adecuado del área, a proveer las condiciones necesarias de funcionalidad, manteniendo el contenido de partículas viables y no viables dentro de niveles aceptables para áreas tan controladas como lo es el área aséptica.

## 9 PROPUESTAS

- Es necesario programar actividades de mantenimiento y monitoreo ambiental de la Unidad Manejadora de Aire, ya que de este sistema depende en gran medida que el área aséptica no sobrepase los niveles de partículas indicados en la NOM-059 NOM-059-SSA1-2013 clasificación ISO-clase 5 (Llenado aséptico). Los resultados obtenidos mostraron que después del cambio en la UMA fue cuando la cantidad de partículas totales se vio incrementada.
- Utilizar la información generada en esta investigación para implementar un rol de sanitizantes específico; el cual este encaminado en disminuir y llegar a eliminar la carga microbiana presente en el área.
- Canalizar esfuerzos para el mantenimiento del área aséptica, ya que de nada servirá implementar un adecuado rol de sanitizantes si no se atienden primero los problemas de infraestructura que se han venido acumulando con el paso del tiempo en esta área.
- Es necesario acondicionar al área con filtros terminales, así como proveer al área un sistema de extracción de aire ya que por el momento no cuenta con ello, lo que genera un deficiente filtrado y flujo del aire que ingresa.
- El monitoreo del área aséptica se realizó de Enero a Junio del año 2013 por lo que sería conveniente programar un nuevo monitoreo para analizar si la carga microbiológica presente es la misma o cambia a lo largo del año.

## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gennaro AR. Remington Farmacia. 19ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 1998.
2. Vera KL. Fabricación de una solución de cloruro de sodio NaCl (0.9%) en un área aséptica de docencia. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM; 2012.
3. Arriaga JG, Ramos EM. Calificación del área aséptica de los laboratorios farmacéuticos Zaragoza. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM; 2009.
4. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
5. Carleton FJ, Agalloco J. Validation of aseptic pharmaceutical processes. USA: Marcel Dekker Inc; 1999.
6. International Standard Organization ISO 14644. Cleanrooms and associated controlled environments.
7. International Standard Organization ISO 14698. Cleanrooms and associated controlled environments Biocontamination control.
8. Tortora GJ. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Estados Unidos de América: Médica Panamericana; 2007.
9. Gutiérrez GV. Prácticas de bioquímica. 4ª ed. Facultad de Odontología Universidad Nacional Autónoma de México. México; 2005.
10. Forbes B. Diagnóstico microbiológico. 12ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 2009.
11. Rodríguez EC. Bacteriología general principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica: Editorial de Costa Rica; 2006.
12. Singleton P. Bacterias en biología, biotecnología y medicina. España: Acribia S. A.; 2004.
13. Finegold SM. Diagnóstico microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 1996.
14. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2004.
15. Olivas EE, Alarcon LR. Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología de alimentos. Academia de microbiología y parasitología. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México; 2004.
16. García V. Introducción a la microbiología. 2ª ed. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia; 2004.
17. Prats G. Microbiología clínica. España: Médica panamericana; 2008.
18. Procedimiento Normalizado de Operación, limpieza de Áreas Asépticas (PNO-0172-08-01). Planta piloto farmacéutica Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.
19. Procedimiento Normalizado de Operación para la Preparación y Esterilización del Uniforme de Área Aséptica (PNO-0100-08-01). Planta piloto farmacéutica Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

20. Procedimiento Normalizado de Operación para el vestido del Uniforme de Área Aséptica (PNO-0099-08-01). Planta piloto farmacéutica Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.
21. Procedimiento Normalizado de Operación para el Uso y Armado del Equipo de Filtración por Membrana (PNO-0117-08-09). Planta piloto farmacéutica Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.
22. Finegold SM, Martin WJ. Diagnóstico microbiológico. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1993.
23. Pelczar M, Reid R, Chan E. Microbiología. 4ª ed. México: McGraw-Hill; 1982.
24. Dulbecco DB, Eisen R, Ginsberg H. Tratado de microbiología. 4ª ed. España: MASSON; 1996.
25. Comisión Interinstitucional de buenas prácticas de fabricación. Guía de buenas prácticas de fabricación. Procesos de limpieza y su validación en áreas de fabricación. Monografía No. 16 2ª ed. México: 1999.
26. Arriaga AG, Ramos EM. Calificación del área aséptica de los laboratorios farmacéuticos Zaragoza: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM; 2009
27. Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health association. 22<sup>nd</sup> ed. Washington DC; 2012.
28. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Liberman Verlag S.A; 2003.
29. Thompson JE, Davidow LW. Práctica contemporánea en farmacia. 2ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
30. Johnson TR, Case CL. Laboratory experiments in microbiology. 3<sup>rd</sup> ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company inc; 1992.
31. Colomé JS, Cano RJ, Kubinski AK, Grady DV. Laboratory exercises in microbiology. The United States of America: West Publishing Company; 1998
32. Cullimore DR. Practical atlas for bacterial identification. United States of America: Lewis Publishers; 2000.
33. Ingraham J, Ingraham C. Introduction to microbiology. 2ª ed. California: Brooks/Cole-Thomson Learning; 2000.
34. Martínez IM. *Neisserias y Moraxella catarrhalis* [Internet]. Disponible en: <http://www.sisman.utm.edu.ec>.
35. Corona AN, Miranda MN, Leños BM, Portillo GL, Hernández AC, Anthon JR, et al. Epidemiologic Study of *Pseudomonas aeruginosa* in Critical Patients and Reservoirs. Archives of Medical Research. 2001; 32: 238-42.
36. Sandel MK, McKillip JL. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. Food Control. 2004; 15: 5-10.
37. Kooker JM, Fox KF. Characterization of *Micrococcus* strains isolated from indoor air. Molecular and cellular probes. 2011; 26: 1-5.
38. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. Journal of hospital infection. 2009; 73: 355-63.

39. Koneman WE, Roberts GD. *Micología, práctica de laboratorio*. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1987.
40. Weissfeld AS, Vance PH. Microbial monitoring in the pharmacy. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2009; 31: 25-30.
41. Gálvez PM, Bermejo MG, Ruiz AM, Gallardo VL, Clares BN. Isolation and characterization of the environmental bacterial and fungi contamination in a pharmaceutical unit of mesenchymal stem cell for clinical use. *Biologicals*. 2009; 40: 330-37.
42. De la Rosa C, Ullan C, Prieto P, Mosso A. *Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica*. Departamento de Microbiología II Facultad de farmacia Universidad Complutense. Madrid; 2000.

## 11 APÉNDICE A

### TINCIÓN DE GRAM MODIFICADA POR HUCKER

#### **A. Cristal violeta (solución concentrada)**

Cristal violeta	20 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

#### **B. Solución concentrada de oxalato**

Oxalato de amonio	1 mL
Agua destilada	100 mL

Mezclar la solución A con la solución B

#### **C. Solución de yodo (Lugol)**

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 mL
Disolver completamente en 5 mL de agua destilada y agregar 240 mL de agua destilada.	

Bicarbonato de sodio al 5% en solución acuosa	60 mL
Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.	

#### **D. Alcohol acetona para decolorar**

Alcohol etílico absoluto	250 mL
Acetona	250 mL
Mezclar y conservar en frasco con tapón esmerilado.	

#### **E. Solución de safranina concentrada**

Safranina O	2.5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL
Solución de trabajo: diluir safranina 1:5 ó 1:10 con tapón esmerilado.	

#### **MÉTODO:**

1. Fijar el frotis con calor
2. Cubrir el frotis con cristal violeta y dejar durante 10 segundos
3. Escurrir el colorante y lavar el resto con lugol
4. Cubrir la preparación con Lugol y dejar 10 segundos
5. Lavar con agua corriente
6. Decolorar con alcohol-acetona durante 10 segundos e inmediatamente enjuagar con agua corriente
7. Cubrir la preparación con safranina durante 10 segundos, lavar y dejar secar al aire
8. Examinar al microscopio con aceite de inmersión (100X) <sup>(32)</sup>