

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
SANITIZANTES”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
*MEDINA PÉREZ JOSÉ LUIS*

DIRECTOR: Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO  
ASESOR: Q.F.B IDALIA LETICIA FLORES GÓMEZ





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.

## DEDICATORIAS.

*A mis padres: Marisela y Ángel, por su enorme apoyo, por que nunca me dejaron, por que me enseñaron a valorar cuanto vale el trabajo, a un cuando por diferentes causas no pudieron estar conmigo en algunos momentos importantes de mi vida, no tengo como agradecer todo su apoyo que me dieron, simplemente gracias.*

*A mi hermano Ángel (que en paz descanse). Por que tú también fuiste parte de este logro tan importante para mí, gracias por tu apoyo en todos los momentos que lo necesite, hoy todo se ve reflejado en lo que concluyo, dios te bendiga donde quiera que estés.*

*A mis hermanos: Erendira y Gonzalo, gracias por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de toda la carrera, gracias por los conocimientos médica, gracias por la ayuda económica que me ofrecías Gonzalo, aunque los problemas sigan algún día estaremos como un verdadera familia los quiero mucho.*

*A mi hijo: Alexis, por todo el momento que me necesitaste y no estuve a tu lado por estar en la escuela, no tengo palabras para decirte lo importante que eres para mi, sabes todo el tiempo que me brindaste tú te lo repondré al doble, hoy que concluye una parte importante de mi vida, gracias hijo te amo.*

*A una persona que en su momento formo parte importante de mi vida: gracias por la motivación que me diste parar continuar mis estudios, mil gracias, sin esa motivación este día no hubiera llegado.*

*A una persona que hoy es mi mundo: por que contigo he aprendido los verdaderos valores de la vida, por que me enseñaste que tan importante es una persona, gracias por tu enorme apoyo que me has brindado, gracias por formar parte de mí, llegaras a ser parte de todo.*

## AGRADECIMIENTOS.

*Al Q.F.B. José Oscar González Moreno, muchas gracias por todo lo que has hecho por mi, no tengo manera de agradecerte, gracias por ser parte de mis amigos, algún día que tú monos te lo esperes te agradeceré todo lo me ayudaste, gracias Oscar.*

*A los miembros de mi jurado, Q.F.B. José Oscar González Moreno, Q.F.B. Idalia Leticia Flores Gómez, Q.F.B. Beatriz Elena Arellano Pimentel, Q.F.B. María Galia Martínez Flores, Q.F.B. Lilia Tequianes Bravo, gracias por haber tenido un tiempo para leer, y revisar este trabajo.*

*Al Q.F.B. Héctor Hugo Martínez Hernández, por permitir realizar este trajo, gracias por todas las facilidades que me brindó “inge”.*

*A la Q.F.B. Imay Sepúlveda Toledo, gracias por todas las facilidades que me ha brindado desde que ingrese al campo laboral.*

*A mis compañeros de trabajo: Isa, Male, Silvia, Lalo, Julito, Inge Berna, gracias por su amistad, por todos los momentos que hemos pasados juntos en el laboratorio, gracias también por su comprensión, hoy día de ve reflejado en esta tesis.*

***JURADO ASIGNADO.***

***PRESIDENTE: Q.F.B. IDALIA LETICA FLORES GÓMEZ***

***VOCAL: Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO***

***SECRETARIO: Q.F.B. MA. GALIA MARTÍNEZ FLORES***

***SUPLENTE: Q.F.B. BEATRÍZ ARELLANO PIMENTEL***

***SUPLENTE: Q.F.B. LILIA TEQUIANES BRAVO***

***SUSTENTANTE: JOSÉ LUIS MEDINA PÉREZ.***

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> definido.	¡Error! Marcador no
<b>INTRODUCCIÓN</b> definido.	¡Error! Marcador no
<b>I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b> definido.	¡Error! Marcador no
<b>A) HISTORÍA</b> definido.	¡Error! Marcador no
<b>B) DEFINICIONES</b> definido.	¡Error! Marcador no
<b>C) CLASIFICACIÓN</b> definido.	¡Error! Marcador no
<b>D) CONDICIONES QUE INFLUYEN SOBRE LA EFICACIA DE LA ACTIVIDAD DE UN AGENTE SANITIZANTE.</b> definido.	¡Error! Marcador no
<b>E) EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN DESINFECTANTE.</b> Marcador no definido.	¡Error!
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>III. OBJETIVOS</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>GENERAL</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>ESPECÍFICOS</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODO</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>A) MATERIAL</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>B) DIAGRAMA DE FLUJO</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>C) METODOLOGÍA</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>VII. SUGERENCIAS</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>VIII. ANEXOS</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>IX. REFERENCIAS</b>	¡Error! Marcador no definido.

## ***RESUMEN***

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio farmacéutico Novag Infancia S.A. de C.V. para evaluar la actividad antimicrobiana de las soluciones sanitizantes utilizadas habitualmente en el proceso de sanitización realizado a entornos de fabricación, equipos y accesorios para la preparación de productos farmacéuticos no estériles.

Para ello previamente se realizo una evaluación inicial de carga microbiana en un área considerada como crítica dentro del laboratorio farmacéutico (área de fabricación de líquidos), con el fin de determinar acciones correctivas o preventivas sobre el proceso de sanitización, o en su defecto a las soluciones sanitizantes, comprobar por medio de este trabajo que las soluciones sanitizantes Hill-Phene II 1.0%, Alcohol etílico 70.0%, Citricidal 1.0%, Alcohol Isopropílico 70.0% y Cloruro de Benzalconio 1.0%, son efectivas en el proceso de sanitización, todo esto para cumplir con normatividades de Secretaria de Salud.

Para llevar acabo esta evaluación se recurrió a las metodologías de hisopado y placas de contacto tipo Rodac, sugeridas en la USP 29, posteriormente las muestras fueron tratadas en el laboratorio de microbiología, sembradas en Agar Soya Trypticaseína (AST) para recuento bacteriano y Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para el recuento de hongos y levaduras.

Los resultados obtenidos en la fase preliminar arrojaron resultados que demuestran la presencia microbiana en equipos, paredes y piso después de la limpieza, los cuales sirvieron de referencia para llevar a cabo la evaluación, los resultados obtenidos después del procesos de sanitización arrojaron resultados muy satisfactorios, pues se logra la reducción al 0% de carga microbiana, después de estar en contacto 30 minutos con el sanitizante, demostrándose así la efectividad de las soluciones sanitizantes a las concentraciones habitualmente usadas.

## ***INTRODUCCIÓN***

Dentro de la industria farmacéutica existe una serie de normativas que buscan garantizar la obtención de un producto de calidad, estas normativas son conocidas como “Buenas Prácticas de Fabricación” (BPF), o sus siglas en inglés GMP. Dentro de la industria farmacéutica se requiere de un programa de limpieza y sanitización de ambientes en los que se fabrican productos farmacéuticos para prevenir la contaminación microbiana de los mismos, estos productos pueden contaminarse a través de sus ingredientes, el agua usada en el proceso de fabricación, los componentes del empaque, el entorno de fabricación, los equipos del procesamiento y los operadores que trabajan en la fabricación de estos productos. (Sanitas, 2000)

Las buenas prácticas de fabricación vigentes hacen hincapié en el tamaño, diseño, construcción y ubicación de los edificios, así como en los materiales utilizados en la construcción, así como también en el flujo adecuado de materiales para facilitar la limpieza, el mantenimiento y las operaciones apropiadas para la fabricación de productos farmacéuticos. Cuando se emplean desinfectantes en el entorno de fabricación, se debe de tener cuidado para evitar la contaminación del producto con la toxicidad de los mismos desinfectantes, los requisitos para el procesamiento aséptico incluyen: pisos, paredes, y techos fáciles de limpiar, con superficies lisas y no porosas, control de temperatura, control de humedad y control de partículas, además de procedimientos de limpieza y desinfección que provean y mantengan las condiciones asépticas. El programa de limpieza y sanitización deberán alcanzar estándares de limpieza específicos, controlar la contaminación microbiana de productos y estar diseñado de tal forma que prevenga la contaminación química, de ingredientes, equipos y superficies, que entran en contacto con el producto.

La OMS define a las BPF como el área de garantía de calidad que asegura que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. Las BPF abarcan todos los aspectos involucrados directa e indirectamente en la fabricación de un producto en forma adecuada, junto con el personal y equipos capacitados que tienen participación en las distintas labores, también incluye la documentación y registro de cada proceso, permitiendo así rastrear la información en todas las etapas de un producto. (USP 29, 2006)

La sanitización es la disminución en un 99.99% del recuento original de microorganismos presentes en un tiempo de 30 segundos, en otras palabras es la disminución del recuento original de gérmenes a niveles seguros para el hombre, en tiempo y cantidades de agua normales en superficies previamente limpias y enjuagadas. Este proceso mismo consta de una serie de funciones y actividades relacionadas, en donde intervienen acciones y equipos determinados, buscan reducir al máximo la contaminación microbiana presente en algún equipo, previamente de un producto anterior o de un desuso prolongado, lo que podría derivar en una contaminación del producto final. Al tratarse de productos farmacéuticos no estériles no se hace necesaria la ausencia de microorganismos, salvo patógenos.

Por otra parte también es importante señalar, que en algunos casos, se puede producir degradación de algunos principios activos, debido a la acción microbiana, lo que implicaría una disminución o pérdida de la actividad terapéutica. (Sanitas, 2000)

En los Estados Unidos la Internacional Official Methods of Analysis publica los métodos oficiales de prueba de desinfectantes, que incluyen la prueba de coeficiente fenólico, la prueba del método de dilución de uso, el método de portador en superficie dura, y la prueba de portador de esporocida. Para demostrar la eficiencia de un desinfectante en un entorno de fabricación de productos farmacéuticos puede considerarse necesaria la realización de las siguientes pruebas: 1.- Pruebas de dilución de uso (analizar la eficiencia de los desinfectantes a varias concentraciones y tiempos de contacto contra una amplia variedad de microorganismos estándares de prueba y aislamientos ambientales), 2.- Prueba de desafío de superficie(usando microorganismos estándares de prueba y microorganismos que son producto de los aislamientos ambientales típicos, aplicando desinfectantes sobre las superficies a las concentraciones de uso seleccionada y durante un tiempo de contacto especificado), 3.- una comparación estadística de la frecuencia del aislamiento y números de microorganismos aislados antes y después de la implementación de un nuevo desinfectante. Para las pruebas de desafío de superficies se utilizan los métodos de Hisopado, enjuague de superficies y placas de contacto para superficies.

La evaluación previa de la carga microbiana y la evaluación misma del proceso de sanitización se efectuarán por los métodos de hisopado y placas de contacto antes señalados, la determinación de puntos de muestreo será definida tomando como base las superficies críticas, de acuerdo al contacto o proximidad que tengan con el producto, posteriormente se dividen las superficies en distintas zonas para hacer más fácil y representativo el muestreo. (Pei Yang, Kim Brson, et al., 2005)

## ***I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA***

### **A) HISTORÍA**

Desde la época de los debates sobre la teoría de los gérmenes de la enfermedad, la destrucción de los microorganismos antes de que lleguen a los pacientes ha sido una de las principales estrategias para prevenir la infección. De hecho Ignaz Semmelweiss aplicó con gran éxito los principios de la desinfección antes de que se aislara la primera bacteria. (Bibek Ray, 2001)

Hasta hoy día nadie sabe efectivamente cuando los primeros humanos aplicaron métodos que podrían controlar los microorganismos, pero quizás el descubrimiento y uso de fuego en los tiempos prehistóricos eran el punto de partida, se sabe que los antiguos humanos grababan describiendo las medidas simples para controlar el decaimiento y la enfermedad, esto aparece en civilizaciones que existieron hace varios miles de años, nosotros, sabemos, también, que estas personas antiguas no tenían ningún concepto de que los gérmenes eran los causantes de la enfermedad, sin embargo ellos tenían una mezcla de creencias religiosas, y habilidades al observar los fenómenos naturales, esta combinación los llevó a tomar medidas simples y a veces bastante arriesgadas que contribuyeron al control de los microorganismos, salando y secando las comidas, fumando, curtiendo, y también exponiendo ropa, y ropa de cama a la luz del sol eran las prácticas prevalecientes entre las civilizaciones tempranas. Los Egipcios mostraron una sofisticada y sorprendente técnica, pues embalsamaban los cuerpos de sus muertos con las sales fuertes y aceites picantes, además introdujeron la filtración de vino y agua, por otra parte los Griegos y Romanos quemaban vestidos a los cadáveres durante las epidemias, ellos también guardan el agua en jarrones de cobre y recipientes de plata. Los ejércitos de Alejandro el grande según informes que se tienen hervían el agua que bebían, además de enterrar sus basuras de los combates. Durante la gran plaga pandémica de la Edad media, era común enterrar los cadáveres en tumbas, quemar la ropa de víctimas de la plaga, y encender maderas de bosques aromáticos en las casas de los enfermos con la creencia que los humos combatirían la enfermedad, en una búsqueda desesperada para alguna clase de protección, los sobrevivientes llevaron los vestidos peculiares y ungieron muy bien sus cuerpos con hierbas, perfumes, y vinagre, estos esfuerzos pueden parecer tonto y anticuado, pero sin embargo pueden haber tenido algunos beneficios, pues la madera ardiente suelta formaldehído que podría actuar como un desinfectante, las hierbas, perfume, y vinagre contienen las sustancias antimicrobianas apacibles. Cada uno de estos métodos tempranos, aunque algo crudo, puso las bases para métodos del control microbianos que todavía están en uso hasta hoy. El azufre ardiente para fumigar las casas y también aplicando este azufre como un ungüento superficial fechan aproximadamente de esta era. (J. A. García, 1999)

## B) DEFINICIONES

**Agentes esterilizantes:** Son aquellos que producen la inactivación total de todas las formas de vida microbiana (es decir, su "muerte" o pérdida irreversible de su viabilidad).

**Agentes desinfectantes o sanitizantes:** Son agentes (sobre todo químicos) antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos, estos agentes son aplicados a material, equipo, objetos, superficies etc., no así en el cuerpo humano, pues pueden y en muchos casos suelen presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inanimados.

**Agentes antisépticos:** Son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican.

**Quimioterápicos:** Son compuestos químicos con actividad microbicida o microbiostática, con una toxicidad suficientemente baja como para permitir su administración a un organismo superior, en cuyos fluidos corporales y tejidos permanece estable un cierto tiempo a concentraciones tales que los hace eficaces como antimicrobianos dentro del organismo.

**Antibiosis:** Fenómeno biológico en el que existe una detección o destrucción del crecimiento bacteriano debido a sustancias producidas por otro ser vivo.

**Asepsia:** Técnica empleada para impedir el acceso de microorganismos al campo de trabajo, evitando así contagios con gérmenes patógenos, eliminando de lugares objetos o cosas, suciedad capaz de producir enfermedad.

**Microbicidas:** Sustancias que matan las formas vegetativas, pero no necesariamente las esporas de un microorganismo.

**Microbiostáticos:** Sustancias que inhiben el crecimiento de un microorganismo.  
(Tay Zavala, 2003, USP 29, 2006)

## C) CLASIFICACIÓN

## ❖ FÍSICOS

La mayor parte de las bacterias patógenas tienen una tolerancia limitada a las variaciones extremas en su medio ambiente físico y escasa capacidad para sobrevivir fuera del organismo vivo. Otras en cambio, producen esporas que son muy resistentes a las condiciones físicas del medio ambiente y que dotan al microorganismo de un valor incrementado de supervivencia. (F. Brooks, 2002)

**Calor húmedo.** El calor húmedo es el preferido para la desinfección, por que su acción letal es más rápida, la exposición de la mayor parte de las bacterias mesófilas no formadoras de esporas al calor húmedo a 60 °C durante 30 minutos es suficiente para la desinfección. La exposición a una temperatura de 80 °C durante 5 a 10 minutos destruye las formas vegetativas de todas las bacterias, levaduras y hongos. La aplicación de calor húmedo para la destrucción de las bacterias puede adoptar diversas formas: ebullición, vapor fluyente y vapor por presión, de ellas, el vapor por presión es la forma más eficaz por que permite alcanzar temperaturas superiores al punto de ebullición del agua, estas temperaturas son necesarias debido a la muy alta resistencia térmica de las esporas bacterianas. La desinfección por calor se realiza dentro de una cámara de presión llamada autoclave, lo esencial en este tipo de desinfección es que la totalidad del material a desinfectar entra en contacto con el vapor saturado a la temperatura requerida durante el tiempo necesario. (F. Brooks, 2002)

**Calor seco.** La desinfección por calor seco requiere temperaturas más altas y un período mas prolongado de calentamiento que la desinfección por vapor, su empleo se limita sobre todo a la desinfección de material de vidrio, aceites, gelatinas y polvos, que son impermeables al vapor. La acción letal es el resultado del calor conducido por el material con el cual entran en contacto los microorganismos y no el del aire caliente que los rodea; esto subraya la importancia de un calentamiento uniforme de la totalidad del objeto a desinfectar. El tipo más ampliamente usado de calor seco es el horno de aire caliente, es preciso un tiempo de desinfección de 2 horas a 180 °C para la destrucción de todos los microorganismos, incluso los formadores de esporas. Otras formas de calor seco incluyen la incineración de materiales de desecho y el pasaje de agujas bacteriológicas, cubreobjetos o pequeños instrumentos por la llama de un mechero Bunsen. (F. Brooks, 2002)

**Radiación ultravioleta.** La efectividad de la luz UV como agente letal y mutágeno está estrechamente relacionada con su longitud de onda, la longitud de onda más efectiva como bactericida está en el espectro de los 240 a 280 nm, siendo el óptimo a unos 260 nm, lo que corresponde con la máxima absorción del DNA. El mecanismo principal del efecto letal de la luz UV sobre las bacterias es atribuible a esta absorción por el DNA y el consiguiente el daño que produce a éste. La radiación UV conduce a la formación de uniones covalentes entre residuos de pirimidina adyacentes entre si ubicados en la misma hebra, lo que da lugar a la formación de dímeros de pirimidina del tipo ciclobutano, estos dímeros distorsionan la forma del DNA e interfieren sobre el apareamiento normal de las hebras de DNA. (F. Brooks, 2002)

## ❖ QUÍMICOS

Aunque los objetos se desinfectan a veces por agentes físicos, las sustancias químicas se utilizan con más frecuencia para la desinfección, muchos factores influyen sobre la eficacia de los desinfectantes químicos, hay que tener en cuenta factores como la clase de microorganismos potencialmente presentes, la concentración y naturaleza del desinfectante que se emplea, y la duración del tratamiento. Numerosos agentes químicos están disponibles para ser utilizados como agentes desinfectantes, cada uno sus propias ventajas e inconvenientes. Los desinfectantes químicos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción en: (F. Brooks, 2002)

### ***Agentes que dañan la membrana.***

**Detergentes.** Los detergentes son moléculas orgánicas que actúan como agentes humectantes y emulsionantes porque poseen tanto extremos hidrófilos polares como hidrófobos no polares debido a su naturaleza anfipática los detergentes son capaces de solubilizar residuos que son insolubles en agua por lo que se les considera como agentes limpiadores muy eficaces. Aunque los detergentes aniónicos tienen algunas propiedades antimicrobianas, solo los catiónicos son desinfectantes eficaces, los más comunes son los compuestos de cuaternario de amonio. Estos productos alteran las membranas microbianas y pueden también desnaturar proteínas. Los detergentes catiónicos como el cloruro de benzalconio y el cloruro de citilpiridino destruyen la mayoría de las bacterias, pero no a *M. tuberculosis* ni a las esporas. Los detergentes catiónicos se emplean a menudo como desinfectantes de utensilios de alimentación y pequeños instrumentos, y son antisépticos cutáneos. Los detergentes aniónicos provocan una gran ruptura de membranas, con efectos de lisis. Son activos sobre todo a pH ácido, preferentemente sobre bacterias Gram-positivas, pero poco sobre Gram-negativas, ya que éstas quedan más protegidas por la barrera del lipopolisacárido de la membrana externa, cuando los detergentes aniónicos se combinan con ácidos, se logran desinfectantes sanitarios muy potentes (debido al efecto sinérgico de ambos componentes) y de rápida actuación (30 segundos). (M. Jay, 2000)

**Compuestos fenólicos.** El fenol fue el primer antiséptico y desinfectante de uso generalizado, en la actualidad el fenol y sus derivados, como son los cresoles, xilenos y ortofenilfenoles son empleados en laboratorios y hospitales. Hasta hoy día el fenol es utilizado como patrón para ensayar el poder desinfectante de otros compuestos. A partir del fenol se pueden lograr desinfectantes con mayor actividad antibacteriana y con menor toxicidad sustituyendo hidrógenos del anillo bencénico por radicales alquílicos o por halógenos como son; cresoles, difenilos halogenados, alquilésteres del para-hidroxibenzoico, aceites esenciales de plantas. Estos compuestos fenólicos son rápidamente bactericidas a bajas concentraciones causando daños a membranas, con pérdida de constituyentes citoplásmicos, inactivación irreversible de oxidasas y deshidrogenasas de membrana y desnaturación de proteínas. Tienen baja solubilidad en agua, por lo que se emplean en fórmulas que incluyen agentes emulsificadores (jabones) que, además, aumenta su actividad. (M. Jay, 2000)

**Alcoholes** Los alcoholes se encuentran entre los desinfectantes y antisépticos más utilizados, son bactericidas y fungicidas, pero no esporocidas, destruyen también algunos

virus con envoltura lipídica. Los alcoholes desorganizan las bicapas lipídicas penetrando en la región hidrocarbonada de los lípidos, permiten observar la interacción de los solventes orgánicos con las membranas lipídicas. Como ya se menciono no afectan a las endosporas, por lo que no son esterilizantes. Su acción desinfectante mejora conforme aumenta la longitud de la cadena alifática de los alcoholes, hasta aquellos con 8 a 10 átomos de carbono (C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>), ya que los alcoholes de cadenas más largas de C<sub>10</sub> tienen una baja solubilidad en agua, los alcoholes alifáticos, en especial el etanol se han usado de forma amplia como desinfectante de la piel por su acción bactericida y su capacidad para eliminar lípidos de las superficies cutáneas, la actividad bactericida del alcohol isopropílico es ligeramente superior a la del etanol y es menos volátil, por estos motivos se ha le recomendado en reemplazo del etanol para la desinfección de termómetros, sin embargo, los efectos tóxicos del alcohol isopropílico son mayores y más prolongados que los provocados por el etanol. Entre los más utilizados se encuentran el etanol e isopropanol (alcohol etílico y alcohol isopropílico). (J. Leveau, 2000)

### ***Agentes que desnaturalizan proteínas.***

En su estado natural cada proteína tiene una conformación característica que es necesario para su funcionamiento adecuado, los agentes que alteran la conformación de las proteínas por desnaturalización producen un desplegamiento de la cadena polipeptídica de manera que las cadenas se presentan arrolladas o enrolladas al azar y de forma irregular. Entre los agentes químicos que desnaturalizan proteínas se encuentran los ácidos y bases fuertes, ácidos orgánicos no disociables, los alcoholes, la cetona y otros solventes orgánicos. Los ácidos y álcalis fuertes son activamente bactericidas, debido a sus grupos H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup> disociados, respectivamente. En principio, su actividad es proporcional al grado de disociación, pero algunos hidróxidos son más potentes de lo sugerido por su mero grado de disociación, debido a la acción tóxica directa que puede ejercer el catión metálico. Existen ciertas especies bacterianas que resisten relativamente bien la acción de bases fuertes, tal es el caso del bacilo tuberculoso, esto se aprovecha para aislarlo y purificarlo: se licua un esputo de enfermo sospechoso en una solución 1M de sosa (NaOH) y se deja 30 minutos antes de sembrar. Bajo estas condiciones, prácticamente sólo sobrevive el ***Mycobacterium tuberculosis***. Los ácidos orgánicos que son poco disociables, ejercen su efecto en cuanto moléculas intactas (sin disociar), que penetran a la célula. El ácido benzoico y el ácido sórbico se usan ampliamente como conservantes alimentarios, ciertos ácidos (como el acético, láctico, propiónico) aparecen en alimentos fermentados, actuando como conservantes naturales. Estos mismos, así como el cítrico se pueden añadir a otros tipos de alimentos, para prolongar el periodo de posible almacenamiento de los productos. El ácido bórico se ha usado como conservante (a veces ilegal) de alimentos, así como en oftalmología. (J. Leveau, 2000)

### **Agentes modificadores de grupos funcionales y ácidos nucleicos**

Esta amplia clase de agentes se caracteriza, en general, por alteran grupos que forman parte de los centros activos de enzimas y otras proteínas, además de alteran grupos funcionales de ácidos nucleicos, componentes de pared celular y de membrana celular, dentro de este grupo de agentes se distinguen los siguientes: (J. Leveau, 2000)

**Metales pesados.** Las sales solubles de Hg, As, Ag, Cu, etc, "envenenan" la actividad enzimática formando mercáptidos con los grupos  $\text{SH}$  de la cisteína. También interaccionan con  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-COOH}$  y radicales fosfato. Los más efectivos son los derivados del mercurio y de la plata que actúan a menos de 1 ppm. Entre los más comunes encontramos los siguientes: (J. Leveau, 2000)

a) Cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). En solución al 0,1% fue muy usado como desinfectante potente, pero es muy tóxico, y apenas se emplea en la actualidad.

b) Compuestos orgánicos de mercurio (como el Mercurocromo, la Mercromina, el Mertiolate): No son totalmente fiables como desinfectantes y presentan cierta (aunque baja) toxicidad, pero se emplean mucho como antisépticos de la piel y de heridas.

c) Sales de fenilmercurio. Son potentes inhibidores no sólo de bacterias, sino de levaduras, hongos y algas. Se usan especialmente en el control de posibles contaminantes microbianos (p.ej., bacterias oportunistas del género *Pseudomonas*) en productos farmacéuticos, cosméticos y oftalmológicos.

d) Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Es un fuerte bactericida frente al gonococo (*Neisseria gonorrhoeae*), y por ello se usa habitualmente para prevenir la oftalmia gonocócica del recién nacido.

e) Coloides orgánicos de plata. En ellos los iones  $\text{Ag}^+$  se van liberando lentamente. Tienen efectos bacteriostáticos, y encuentran su principal aplicación en oftalmología.

f) Cremas de nitrato de plata y sulfodiazina de plata. Usadas para el tratamiento de quemaduras, han reducido notablemente la mortalidad derivada de las grandes quemaduras.

**Agentes oxidantes.** Los efectos de los agentes oxidantes es la inactivación de proteínas enzimáticas (convirtiendo los radicales  $\text{SH}$  en disulfuros  $\text{-S-S-}$ ). Además, los más potentes también atacan radicales amino, el grupo indol (presente en el triptófano), y la tirosina de la célula. Entre los más comunes se encuentran los siguientes: (J. Leveau, 2000, p.225)

a) Agua oxigenada. El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), en solución al 3%, se usó en otro tiempo como desinfectante, pero está actualmente en desuso, debido a que algunas bacterias son resistentes, por la posesión de catalasas y peroxidasas. Además, en desinfección de heridas abiertas su efecto es muy pobre, porque el agua oxigenada es descompuesta por la

catalasa tisular. Se emplea en la desinfección de lentillas blandas, dejando tiempo suficiente de actuación. También, en desinfección de superficies inertes y equipos quirúrgicos.

b) Permanganato potásico ( $K_2MnO_4$ ). El permanganato de potasio es un fuerte oxidante que se emplea como antiséptico uretral al 1.0%.

c) ácido peracético ( $CH_3-CO-O-OH$ ). Es un fuerte agente oxidante. En forma de vapor se usa en la esterilización de cámaras de cría de animales libres de gérmenes.

**Halógenos.** Son bactericidas muy útiles y muy potentes. El yodo no tiene parangón como desinfectante de la piel, y el cloro no tiene igual en el tratamiento de aguas. Son únicos entre los desinfectantes en el sentido en que su actividad es casi exclusivamente bactericida y en que son efectivos contra microorganismos que esporulan. Entre los más comunes encontramos los siguientes: (J. Leveau, 2000)

a) Yodo: Aparte de su efecto oxidante, se combina irreversiblemente con residuos de tirosina de las proteínas.

b) Tintura de yodo: es una mezcla de 2% de  $I_2$  + 2% de IK en alcohol al 70%. Su máximo efecto bactericida lo tiene a  $pH < 6$ . Es un magnífico antiséptico de la piel, de hecho el mejor de los conocidos, pero tiene un efecto doloroso y cáustico en heridas abiertas.

c) Iodóforos: son mezclas de yodo con agentes tensoactivos (detergentes), en los que éstos actúan como portadores del yodo, al que van liberando lentamente, sin provocar irritación. También se emplean en desinfección de instalaciones de industrias alimentarias.

d) Cloro. El cloro fue uno de los primeros antisépticos en usarse (antes de conocerse su mecanismo, e incluso antes de que se supiera el auténtico papel de los microorganismos en las enfermedades infecciosas). El cloro se presenta bajo las formas de  $Cl_2$  (gaseoso), hipocloritos y cloraminas. El efecto desinfectante se debe a la liberación de cloro libre ( $Cl_2$ ); a su vez, el  $Cl_2$  reacciona con el agua para dar ácido hipocloroso, que a pH ácido o neutro es un oxidante fuerte:

e) Cloro gaseoso. De 1-3 ppm se usa en la cloración de aguas para bebida y de aguas de piscinas. Su actividad se ve muy influida (mermada) por la presencia de materia orgánica; por ello, se suele determinar la demanda de cloro del agua a tratar. Descontada dicha demanda, el cloro gaseoso mata rápidamente (15-30 segundos) a sólo 1 ppm.

f) Soluciones de hipocloritos: hipocloritos de sodio, de calcio o de litio. A 200 ppm de cloro se usan ampliamente, ya como líquidos (lejías), o en polvo, en industrias alimentarias y lácteas (para desinfectar el equipamiento y maquinaria que ha de entrar en contacto con los alimentos a procesar), en restaurantes, hoteles, hospitales, etc.

**Tinturas de colorantes básicos.** Algunos colorantes derivados de la destilación del alquitrán de hulla, sobre todo los trifenilmetanos y las acridinas, no sólo tiñen las bacterias, sino que también actúan como antibacterianos, incluso a pequeñas concentraciones. Los colorantes básicos son los más efectivos. En general, su mecanismo depende de su afinidad

hacia los grupos fosfato (ácidos) presentes en las nucleoproteínas. Encuentran su uso como antisépticos de lesiones dermatológicas, infecciones de la piel y pequeñas heridas. Su principal inconveniente es que muchos de ellos se inactivan en presencia de suero y otras proteínas, entre las más comunes tenemos a los siguientes: (J. Leveau, 2000)

a) Colorantes de trifenilmetano. Son derivados de la anilina, entre ellos se encuentran el verde brillante, el verde malaquita, el violeta de genciana, el violeta cristal y la fucsina básica. Son muy selectivos hacia bacterias Gram-positivas, a concentraciones de sólo 0,2-2 ppm. En cambio, las bacterias Gram-negativas suelen ser resistentes, debido a su membrana externa. El efecto antibacteriano se debe a la pseudobase, que es más lipófila que el respectivo catión, y bajo esa forma accede al interior celular, donde se une a los grupos fosfato de los ácidos nucleicos.

b) Colorantes derivados de la acridina. Llamados también flavinas, por su color amarillento, los ejemplos típicos son la acriflavina, la proflavina y la tripoflavina. Interfieren en la biosíntesis de ácidos nucleicos (intercalándose en la doble hélice del ADN) y proteínas. Son bactericidas y bacteriostáticos sobre una gran diversidad de bacterias. A diferencia de las anilinas, ejercen su acción también en presencia de materiales como suero, pus, etc.

**Agentes alquilantes.** Son agentes esterilizantes, activos tanto sobre células vegetativas como sobre esporas, que ejercen su efecto letal por su acción alquilante de proteínas y ácidos nucleicos, la inhibición producida por estos agentes es irreversible, como consecuencia de una modificación de las enzimas y la inhibición de la actividad enzimática, a continuación se mencionan algunos de los más comunes: (J. Leveau, 20008)

a) Formaldehído (HCHO). El formaldehído ejerce su acción realizando una alquilación, la alquilación la produce reemplazando hidrógenos lábiles de ciertos grupos químicos ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$  y  $\text{SH}$ ), produciendo hidroximetilaciones y condensaciones (entrecruzamientos) de proteínas y ácidos nucleicos. Se usa comercialmente como gas, en la descontaminación de habitaciones, como formalina que se emplea para preservar tejidos, en líquidos de embalsamamiento, y al 0,2-0,4% en la preparación de vacunas de virus.

b) Glutaraldehído. Este agente alquilante es menos tóxico y más potente que el formaldehído, y no se afecta por materiales con proteínas. Cada vez se emplea más como esterilizante frío de instrumental quirúrgico. Es el único recomendado para esterilizar equipamiento de terapia respiratoria.

c) Oxido de etileno. Tiene un efecto similar al del formaldehído: Sustituciones y entrecruzamientos irreversibles en grupos amino de ácidos nucleicos, y de proteínas. También reacciona con grupos fosfato y anillos nitrogenados de los ácidos nucleicos. Es un agente empleado como esterilizante gaseoso, aunque es de acción lenta. Se emplea cuando no se puede recurrir a la esterilización por calor: esterilización de material de plástico, drogas, ciertos productos biológicos, equipamiento electrónico. La operación se realiza en cámaras parecidas al autoclave. Sin embargo, es un método caro y exhibe ciertos riesgos: presenta acción vesicante y toxicidad para el hombre (mutágeno y carcinógeno).

d)  $\beta$ -propionil-lactona. Es 25 veces más activa que el formaldehído. Actúa como gas en presencia de 80-90% de humedad relativa, aunque es poco penetrante. (J. Leveau, 2000)

Tabla No 1 Última Clasificación actualizada de los sanitizantes (USP 29,2006)

Entidad química	Clasificación	Ejemplo
Aldehídos	Agente esporocida	Glutaldehído al 2%0
Alcoholes	Desinfectante de uso general, antiséptico y agente antiviral.	Alcohol etílico 70% Alcohol isopropílico 70%
Cloro e hipoclorito de sodio	Agente esporocida	Hipoclorito de sodio al 0.5%
Fenólicos	Desinfectante de uso general	500 $\mu$ g por g de cresol 500 $\mu$ g por g de cloroxilenol
Ozono	Agente esporocida	8 % de gas por peso
Peróxido de hidrogeno	Esterilizante de fase vapor, agente esporocida líquido, antiséptico	4 $\mu$ g por g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vapor, solución del 10 % al 25 %, solución al 3 %
Diguanidas sustituidas	Agente antiséptico	Gluconato de clorhexidina al 0.5%
Ácido paracético	Esterilizante líquido, esterilizante de fase vapor	Ácido paracético al 0.2 %, 1 $\mu$ g por g de ácido paracético
Oxido de etileno	Esterilizante de fase vapor	600 $\mu$ g por g de oxido de etileno
Compuestos cuaternarios de amonio	Desinfectante de uso general y antiséptico	200 $\mu$ g por g de cloruro de benzalconio
$\beta$ -propiolectona	Agente esporocida	100 $\mu$ g por g de $\beta$ -propiolactona

## D) CONDICIONES QUE INFLUYEN SOBRE LA EFICACIA DE LA ACTIVIDAD DE UN AGENTE SANITIZANTE.

**Concentración del agente.** A menudo, pero no siempre cuanto más alta sea la concentración de un agente más rápidamente son destruidos los microorganismos. Sin embargo, la eficiencia de un agente no está normalmente relacionada directamente con su concentración; así, un aumento pequeño de su concentración puede ocasionar un incremento exponencial de su eficiencia, pero, por encima de este punto, puede que los aumentos en su eficiencia no incrementen en lo absoluto la velocidad de destrucción. A veces un agente es más eficaz a concentraciones bajas, tomando como ejemplo el etanol al 70% es más eficaz que al 95% pues su actividad aumenta en presencia de agua. (J. Leveau, 2000)

**Tiempo de exposición.** Cuanto más tiempo se exponga una población microbiana a un agente bactericida más organismos se destruirán. (J. Leveau, 2000)

**pH.** El pH afecta tanto a la carga superficial neta de la bacteria como al grado de ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas, y por lo tanto son más efectivos. Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos, mientras que los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalinos. (J. Leveau, 2000)

**Temperatura.** Normalmente, al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos agentes la subida de 10 grados supone duplicar la tasa de muerte. Pero con el fenol, la subida de 10 grados representa multiplicar por 5 o por 8 la eficacia. (J. Leveau, 2000)

**Composición de la población microbiana.** La eficacia de un agente varía considerablemente con la naturaleza de los organismos que se van a tratar porque estos difieren sustancialmente en cuanto a susceptibilidad. Las endosporas bacterianas son mucho más resistentes a la mayoría de los agentes Antimicrobianos que las formas vegetativas, y las células más jóvenes se destruyen normalmente con más facilidad que los organismos maduros. Por otra parte, algunas especies son capaces de soportar mejor que otras condiciones adversas. *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, es mucho más resistente a los agentes Antimicrobianos que la mayoría de las bacterias. (J. Leveau, 2000)

**Tamaño de la población.** En cada intervalo de tiempo se destruye una fracción igual de población microbiana, por tanto, una población mayor necesitará más tiempo para morir que una más pequeña. (J. Leveau, 2000)

**Presencia de materiales extraños.** La existencia de materia orgánica en el material a tratar afecta negativamente la potencia de los desinfectantes de tipo oxidante y de tipo desnaturante de proteínas, hasta el punto que pueden llegar a hacerlos inactivos en cuanto a su poder desinfectante y/o esterilizante. Existen tres mecanismos por los que se pierde la actividad de los agentes: Adsorción del desinfectante a coloides de proteínas,

formación de complejos inertes o poco activos, unión de grupos activos del desinfectante a proteínas extrañas. (J. Leveau, 2000)

**Ambiente local.** La población microbiana que debe ser controlada no está aislada, sino en el contexto de una serie de factores ambientales que pueden ofrecerle protección o facilitar su destrucción. Por ejemplo, como el calor es más eficaz en medios de pH ácido, los alimentos y las bebidas ácidas, como frutas y tomates, se pasteurizan con más efectividad que los alimentos con valores de pH más altos, como la leche. Otro factor ambiental importante es la materia orgánica que puede proteger a los microorganismos frente al calor y a los desinfectantes químicos. Por ello, puede ser necesario limpiar un objeto antes de su desinfección o esterilización. Jeringuillas y equipamiento médico deberían limpiarse antes de la esterilización ya que la presencia de materia orgánica podría proteger a los patógenos, incrementando el riesgo de infección. El mismo cuidado hay que tener cuando se destruyen los agentes patógenos durante el tratamiento del agua para ser potabilizada. (J. Leveau, 2000)

## **E) EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN DESINFECTANTE.**

El análisis de los agentes antimicrobianos es un proceso complejo, en los EE.UU. es regulado por 2 organismos federales, uno de ellos el departamento de protección ambiental que controla los desinfectantes y la FDA (Food and Drug Administration) que se encarga de los agentes que son utilizados en seres humanos y animales.

El análisis de los agentes Antimicrobianos comienza a menudo con una prueba inicial para ver si son eficaces y a que concentraciones. El método mas utilizado para el estudio de un desinfectante es la prueba del coeficiente fenólico en la que se compara la eficiencia de un desinfectante con la del fenol. Se prepara una serie de diluciones del fenol y del desinfectante experimental y se inoculan con bacterias de ensayo que son *S. typhi* y *S. aureus*, luego son mantenidas en un baño de agua a una temperatura entre 20 y 37° C, a continuación a intervalos de 5 minutos se toman muestras de estos tubos mismas que son inoculadas en medios de cultivo comunes y se incuban durante 2 o más días. La mayor dilución del desinfectante experimental que destruye a las bacterias después de 10 minutos de exposición, pero no después de 5 minutos se emplea para calcular el coeficiente fenólico. El recíproco de esta dilución del desinfectante experimental se divide entre la del fenol para obtener su coeficiente fenólico, por ejemplo, si suponemos que la dilución del fenol era 1/90, y la dilución eficaz máxima de un desinfectante X fuese 1/450 el coeficiente fenólico del desinfectante X sería 5, un valor superior a 1 significa que el desinfectante es mas eficaz que el fenol, cuanto mayor sea el valor del coeficiente fenólico, mas eficaz será el desinfectante en estas condiciones de ensayo. (Pei Yang, Kim Burson, et al, 2005)

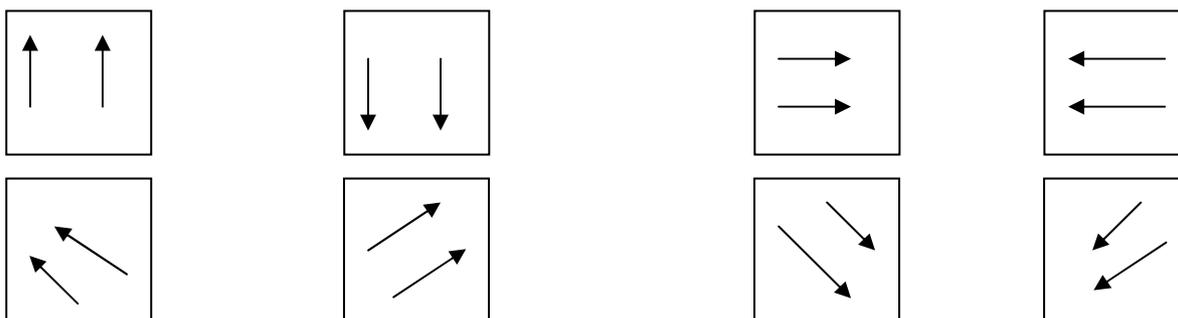
La prueba del coeficiente fenólico es un método muy útil para el resultado inicial de un potencial desinfectante, pero este puede ser muy engañoso si se considera como una indicación directa de la potencia de un desinfectante durante su uso normal, esto se debe a que el coeficiente fenólico se determina en condiciones rigurosamente controladas y con

cultivos puros mientras que los desinfectantes se utilizan normalmente en poblaciones mixtas, en presencia de materia orgánica y en variadas condiciones ambientales.

Como no existe una estandarización de métodos y procedimientos para el muestreo de superficies y equipos de producción farmacéutica, se emplea uno de los métodos sugeridos por la USP 29 y la FDA método de hisopado, método de enjuague, y método de placas tipo Rodac (siendo la preferida por la FDA el muestreo con hisopo). (Pei Yang, Kim Burson, et al, 2005,)

La técnica del hisopado consiste en aplicar una torunda estéril previamente humedecida con diluyente para hisopos en una zona delimitada por un marco o plantilla de acero inoxidable de 25 cm<sup>2</sup>, el hisopo se frota varias veces en diferentes direcciones (Fig. 1) sobre la superficie a muestrear, luego el hisopo se sumerge en la misma solución donde se agita y se lleva a laboratorio de Microbiología para ser analizado en un lapso de 2 horas o mantenerse en refrigeración a 4° C antes que sean procesadas en un lapso no mayor a 24 horas desde su recolección. La técnica de hisopo de realizará con las manos protegidas con guantes de látex estériles. Si esta técnica es utilizada en condiciones normales (sin previa limpieza y sanitización del equipo o superficie) se utiliza una solución humectante enriquecida; por lo contrario si esta técnica es utilizada después de la limpieza y sanitización deberán utilizarse soluciones humectantes que contengan neutralizantes para los sanitizantes. (Pei Yang, Kim Burson, et al, 2005), la técnica de enjuague se basa en aplicar una solución medida de buffer con Tween 80 estéril en la zona seleccionada para muestrear, después se recoge el fluido en un recipiente estéril de tamaño adecuado, este fluido es filtrado con filtros de membrana de 0.45µm, los que a continuación son llevados directamente a una caja Petri con medio de cultivo adecuado, cuidando que la totalidad de la superficie se apoye firmemente en el agar, donde las sustancias nutritivas difunden hacia el filtro. La técnica de placas tipo Rodac, esta forma de monitoreo se recomienda para superficies regulares como pisos, paredes, techos, puertas, se abre la placa por la parte que contiene el medio de cultivo determinado, y se presiona contra el área a monitorear, después se cierra la placa e inmediatamente se mete a incubar. (Sanitas, 2000)

Fig. 1 Diagrama de direcciones para frotar hisopos. (Sanitas, 2000)



## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En los laboratorios farmacéuticos NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V., año con año se deben de evaluar las soluciones sanitizantes que son utilizadas en áreas de fabricación, equipos, utensilios y área de microbiología para los procesos de sanitización. Para ellos se cuenta con los registros del año anterior que demostraban que las soluciones sanitizantes utilizadas eran eficaces a las concentraciones habitualmente usadas en las diferentes áreas de producción, equipo y área de Microbiología en el proceso de sanitización.

Para que un producto farmacéutico salga al mercado debe de cumplir con especificaciones de control de calidad, una de ellas es la determinación de la carga microbiana la cual debe de estar exenta de patógenos y límites determinados de mesófilos aerobios en los diferentes preparados farmacéuticos, por eso es importante que las soluciones sanitizantes utilizadas en los procesos de sanitización de áreas y equipos sean efectivas. Razón por la cual en esta evaluación se determina “*in vitro e in situ*” la eficiencia de las soluciones sanitizantes utilizadas en dicho proceso así como el desarrollo o actualización de la documentación que se genere de esta evaluación. Para que un producto farmacéutico cumpla con especificaciones microbiológicas es necesario realizar periódicamente sanitizaciones que ayuden a preservar las condiciones asépticas en las cuales se operan los diferentes procesos. Una sanitización adecuada debe ser realizada de tal manera que proteja debidamente todas las superficies del cuarto limpio, las superficies externas de los equipos; así mismo todo aquel material de trabajo que se encuentre dentro del área, esta sanitización periódica va enfocada a la eliminación de los posibles microorganismos que se puedan encontrar depositados o adheridos a las superficies antes mencionadas, provocando así una contaminación del producto final.

### **III. OBJETIVOS**

#### **GENERAL**

- Evaluar la actividad antimicrobiana de las soluciones sanitizantes utilizadas en el laboratorio farmacéutico en el proceso de sanitización.

#### **ESPECÍFICOS**

- Desarrollar PNO'S para la evaluación de las soluciones sanitizantes, en el proceso de sanitización, así como preparación, control y rotación de estas soluciones.
- Comprobar que el proceso de sanitización es eficiente frente a un tipo determinado de microorganismos, y microorganismos presentes en equipos y entornos de fabricación de un área determinada.
- Evaluar la eficiencia de las soluciones sanitizantes en el área de fabricación de líquidos del laboratorio farmacéutico.
- Tomar acciones correctivas o preventivas para el proceso de sanitización, o en su defecto sobre las soluciones sanitizantes.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODO**

### **A) MATERIAL**

#### **Material empleado.**

- Asa bacteriológica.
- Mechero Bunsen.
- Cajas Petri estériles desechables Kimax.
- Tubos con tapa de 20 mm x 150 mm estériles Kimax.
- Tubos con tapa de 20 mm x 175 mm estériles Kimax.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapones estériles Kimax.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL estériles Kimax.
- Micropipeta para 1000 µL Kimax.
- Puntas para Micropipeta de 1000 µL Kimax.
- Probeta de 25 mL estéril Kimax.
- Probetas de 100 mL estériles Kimax.
- Matraces volumétricos de 1000 mL Kimax.
- Matraces Erlenmeyer de 1000 mL Kimax.
- Gradilla para tubos.
- Contenedor de desechos.

#### **Equipo empleado**

- Campana de flujo laminar; Modelo GMFL-A12, Serie FI-5/5.
- Autoclave; Modelo MOES1624CCY, Serie NG9104618.
- Incubadora Imperial III, Serie 0293-0291.
- Cronómetro ; Modelo 1011-0117
- Refrigerador: LG 2311
- Espectrofotómetro: Spectronyc UV-VIS, Serie ns342-12

### **Soluciones.**

- Solución neutralizante.
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2.
- Solución peptonada.
- Alcohol etílico 96%, No Lot. 001G/LT-24-11-06/228, Licores Típicos Mexicanos S.A. de C.V.
- Hill-Phene II solución concentrada, No Lot. 178-78SCH, Biocleaner Enterprise S.A. de C.V.
- Alcohol Isopropílico puro, No Lot. 021202T14RP, Química Génesis S.A. de C.V.
- Cloruro de Benzalconio solución al 10%, No Lot. 140776, Hycel de México S.A. de C.V.
- Citricidal, solución concentrada, No Lot. 93102-6D9, ABCD S.A. de C.V.

### **Material Biológico.**

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Bacillus cereus* ATCC 11778
- *Salmonella typhi* ATCC 6539

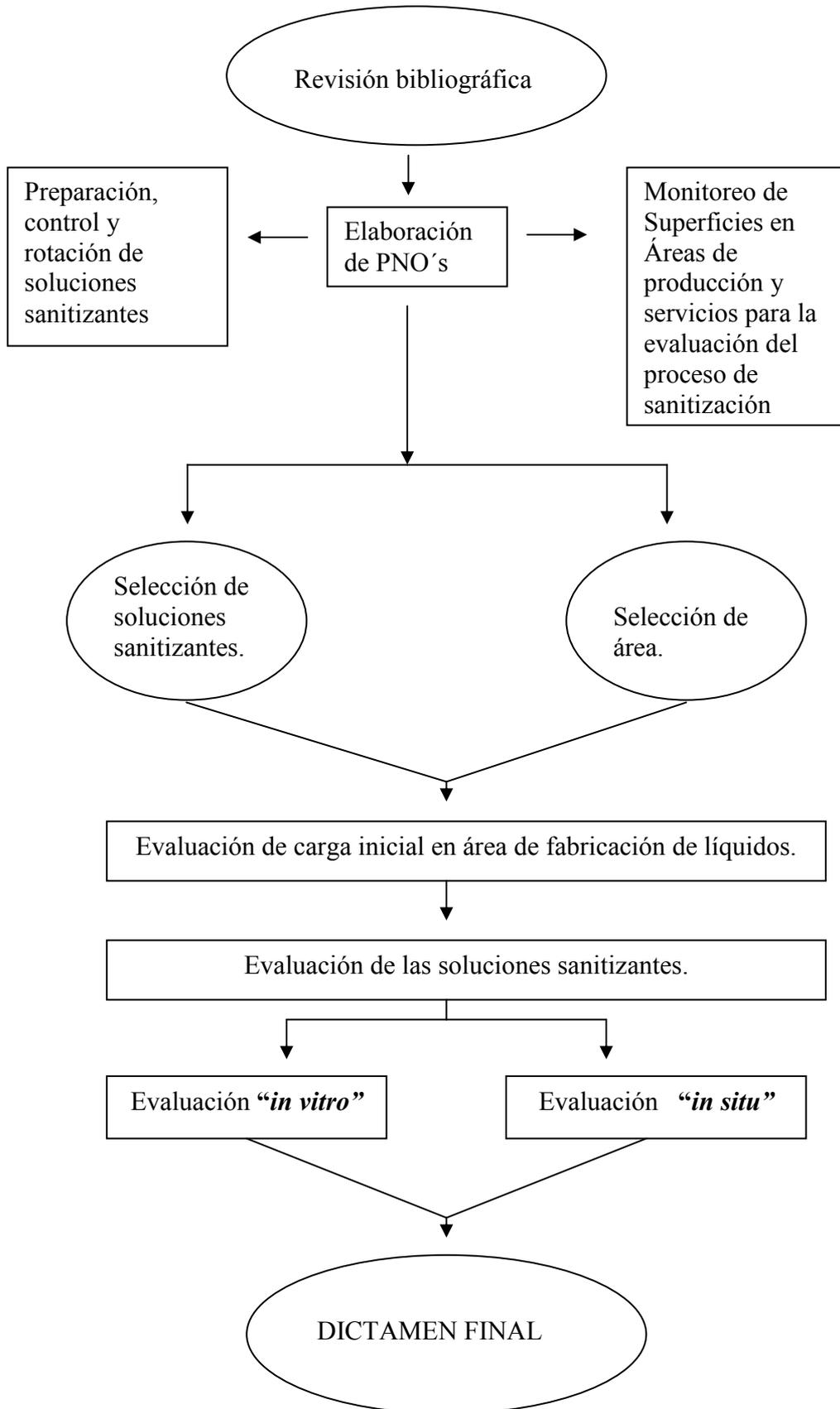
### **Medios de cultivo.**

- Agar Nutritivo, No Lot. 4016930, Bioxon.
- Agar Soya Tripticaseína, No Lot. VM644158-634, Merck.
- Agar Dextrosa Sabouraud, No Lot. VM630638-627, Merck.
- Peptona de caseína, No Lot. PCA0106, Bioxon.

### **Reactivos.**

- Cloruro de sodio, No Lot. 7581X36D51, Mallinckrodt.
- Fosfato de potasio monobásico, No Lot. 7100A38D54, Mallinckrodt.
- Fosfato de potasio dibásico, No Lot, 3252-05, J.T. Baker.
- Polisorbato 80 (Tween 80), No Lot. 5427/DFC321, Química Génesis.

**B) DIAGRAMA DE FLUJO**



## C) METODOLOGÍA

### Preparación de la suspensión de los microorganismos para la prueba “*in vitro*”.

- Sembrar masivamente cada microorganismo de prueba (*S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* y *S. tiphy*) en dos tubos de 20 x 175 que contengan 15 mL de Agar nutritivo como medio de cultivo inclinado e incubar de 20 a 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Terminado el tiempo de incubación cosechar el crecimiento de cada tubo con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos diluida, transferir la suspensión a un tubo de ensayo estéril y guardar esta suspensión para la cuenta inicial de los microorganismos para la prueba “*in vitro*”.

### Cuenta inicial de los microorganismos para la prueba “*in vitro*”.

- Medir exactamente 99 mL de solución reguladora de fosfatos diluida estéril y transferirla a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL con tapón. Agitar el matraz y suspender la agitación justamente antes de la inoculación, para que en ese momento aún exista movimiento residual del líquido y así facilite la incorporación del inóculo.
- Inocular 1 mL de la suspensión ajustada del microorganismo de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz. Está será la dilución  $10^{-2}$ .
- En forma inmediata a lo descrito en el punto anterior. Mezclar la suspensión del Matraz que contiene la dilución  $10^{-2}$  y transferir 1 mL de esta suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de solución reguladora de fosfatos diluida estéril, está será la dilución  $10^{-3}$ .
- Continuar sucesivamente hasta obtener diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ .
- Transferir alícuotas de 1 mL de cada dilución a cajas Petri estériles.
- Adicionar de 15 a 20 mL de Agar cuenta estándar, homogenizar con movimientos suaves rotatorios, dejar solidificar el medio.
- Guardar en refrigeración las diluciones hasta el día de la prueba “*in vitro*” de las soluciones sanitizantes.
- Incubar las placas en forma invertida, durante 48 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

- Contar las UFC de las placas después del periodo de incubación con la ayuda de un cuenta colonias, para el método de prueba se tomará la dilución cuya cuenta sea entre 75-125 UFC / mL.
- Realizar todo lo anterior para cada microorganismo.

### **PRUEBA “*in vitro*” DE LAS SOLUCIONES SANITIZANTES.**

La Prueba se realizará por duplicado

- Preparar los sanitizantes a las concentraciones usadas para la sanitización de rutina, de acuerdo al PNO GCC-PNO-JLA- 47 “Preparación, control y rotación de las soluciones sanitizantes”.
- Medir exactamente 99 mL del sanitizante a evaluar y transferir a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL con tapón. Agitar el matraz y suspender la agitación justamente antes de la inoculación del microorganismo de prueba, para que en ese momento aún exista movimiento residual del líquido y así facilite la incorporación del inóculo.
- Inocular 1 mL de la suspensión ajustada de cada uno del microorganismo de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz. Agitar el matraz y exactamente 30 segundos después de la inoculación, transferir 1 mL de esta suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante diluida estéril. Esta será la dilución  $10^{-3}$ .
- En forma inmediata a lo descrito en el punto anterior mezclar la suspensión del tubo que contiene la dilución  $10^{-3}$  y transferir 1 mL de esta suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de solución neutralizante diluida estéril. Esta será la dilución  $10^{-4}$ .
- Continuar sucesivamente como se indica en el punto anterior hasta obtener diluciones de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ .
- Transferir alícuotas de 1 mL de cada dilución a cajas Petri estériles.
- Adicionar de 15 a 20 mL de Agar cuenta estándar con solución neutralizante, homogenizar con movimientos suaves rotatorios, dejar solidificar el medio.
- Incubar las placas en forma invertida, durante 48 h a  $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .
- Contar las UFC de las placas después del periodo de incubación.
- Realizar el mismo procedimiento para cada microorganismo de prueba, y para cada solución sanitizante a las concentraciones habitualmente usadas.

***EVALUACIÓN PREVIA “in situ” DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE HISOPADO.***

Antes de llevar a cabo la evaluación de los sanitizantes se deberá realizar una prueba inicial de carga microbiana en un área crítica (fabricación de líquidos) en equipos y superficies con la técnica de Hisopado para equipos y Placas Rodac para superficies y piso de dicha área con el fin de llevar a cabo una correcta evaluación de los sanitizantes.

- Preparar la cantidad suficientes de tubos para el muestreo, conteniendo 10 mL de solución salina al 0.1%.
- Identificar cada tubo con el código del área y lugar de muestreo.
- Llevar al área donde se llevara a cabo el monitoreo la cantidad suficiente de hisopos estériles
- Para iniciar el muestreo humedecer un hisopo estéril en la solución salina al 0.1%.
- Eliminar el exceso de solución mediante presión del hisopo contra la pared del tubo.
- Frotar en varias direcciones sobre la superficie a monitorear, delimitada por un marco a plantilla estéril de acero inoxidable de 25 cm<sup>2</sup>.
- Transferir las muestras al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento. En caso de que no se procesen las muestras en el transcurso de la siguiente hora, se deben almacenar en refrigeración.
- Agitar los tubos en un vortex durante 15 a 20 seg.
- En forma aséptica, transferir 1.0 mL de la solución del tubo a una placa Petri estéril identificada con el número del tubo correspondiente, adicionar aproximadamente 15 mL de Agar de Soya Trypticaseína (AST). Dejar solidificar el Agar e incubar en forma invertida durante 48 horas a  $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ .
- En forma aséptica transferir 1.0 mL de la solución del tubo a una placa Petri estéril identificada con el número del tubo correspondiente, adicionar aproximadamente 15 mL de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Dejar solidificar el Agar e incubar en forma invertida de 5-7 días a  $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ .
- Contar y registrar el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por placa.

***EVALUACIÓN PREVIA “in situ” DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACA RODAC.***

- Se emplearon placas de contacto tipo RODAC con medio Agar de Soya Trypticaseína (ATS) y Agar Dextrosa Sabouraud (ADS).
- Identificar cada placa de acuerdo al área y al sitio a monitorear (puerta, pared, piso, etc.)
- Abrir las placas RODAC por la parte que contiene el medio de cultivo, tocar con el medio de cultivo el sitio señalado previamente al azar, retirar y cerrar las placas.
- Una vez muestreado, transferir las muestras al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento.
- Incubar las placas en forma invertida de Agar de Soya Trypticaseína AST a  $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas y las placas de Agar Dextrosa Sabouraud ADS a  $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  durante 5-7 días, para el recuento de bacterias hongos y levaduras.
- Inspeccionar cada placa, contar y registrar el número de UFC por placa.

***EVALUACIÓN “in situ” DE LAS SOLUCIONES SANITIZANTES POR EL MÉTODO DE HISOPADO.***

- Preparar la cantidad suficiente de tubos para el muestreo conteniendo 10 mL de solución salina al 0.1% con Tween 80 como neutralizador de los agentes sanitizantes.
- Identificar cada tubo con el código del área y lugar de muestreo.
- Llevar al área donde se llevara a cabo el monitoreo la cantidad suficiente de hisopos estériles
- .
- Para iniciar el muestreo humedecer un hisopo estéril en la solución salina al 0.1% con Tween 80.
- Eliminar el exceso de solución mediante presión del hisopo contra la pared del tubo.
- Frotar en varias direcciones sobre la superficie a monitorear, delimitada por un marco a plantilla estéril de acero inoxidable de  $25\text{ cm}^2$ .
- Transferir las muestras al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento. En caso de que no se procesen las muestras en el transcurso de la siguiente hora, se deben almacenar en refrigeración.

- Agitar los tubos en un vortex durante 15 a 20 seg.
- En forma aséptica, transferir 1.0 mL de la solución del tubo a una placa Petri estéril identificada con el número del tubo correspondiente, adicionar aproximadamente 15 mL de Agar de Soya Trypticaseína (AST). Dejar solidificar el Agar e incubar en forma invertida durante 48 horas a  $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ .
- En forma aséptica transferir 1.0 mL de la solución del tubo a una placa Petri estéril identificada con el número del tubo correspondiente, adicionar aproximadamente 15 mL de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Dejar solidificar el Agar e incubar en forma invertida de 5-7 días a  $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ .
- Contar y registrar el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por placa.

#### **EVALUACIÓN “*in situ*” DE LAS SOLUCIONES SANITIZANTES POR EL MÉTODO DE PLACA RODAC.**

- Se emplearon placas de contacto tipo RODAC con medio Agar de Soya Trypticaseína ATS y Agar Dextrosa Sabouraud ADS con Tween 80 como neutralizador de los agentes sanitizantes.
- Identificar cada placa de acuerdo al área y al sitio a monitorear (puerta, pared, piso, etc.)
- Abrir las placas RODAC por la parte que contiene el medio de cultivo, tocar con el medio de cultivo el sitio señalado, retirar y cerrar las placas.
- Una vez muestreado, transferir las muestras al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento.
- Incubar las placas en forma invertida de Agar de Soya Trypticaseína AST a  $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas y las placas de Agar Dextrosa Sabouraud ADS a  $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  durante 5-7 días.
- Inspeccionar cada placa, contar y registrar el número de UFC por placa.

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN No 1**

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO:</b> Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

## **Monitoreo de Superficies en Áreas de Producción y Servicios para la evaluación del proceso de sanitización.**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Evaluar la actividad antimicrobiana de los sanitizantes en los procedimientos de sanitización bajo condiciones normales de uso en las áreas limpias y el área de trabajo.

### **2. ALCANCE:**

Este procedimiento aplica cada vez que se realice una sanitización, para el monitoreo de superficies con hisopos y placas tipo Rodac en las áreas limpias y el áreas de trabajo, de Novas Infancia, S.A. de C.V. (Superficies tales como pisos, paredes, techos, ventanas, puertas, mesas de trabajo, equipo de fabricación).

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>AUTORIZÓ</b>
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**3. RESPONSABILIDADES:**

**3.1** Es responsabilidad de la Gerencia de Control de Calidad y de la Gerencia de Producción coordinar las actividades establecidas en este procedimiento y su implementación en sus respectivas áreas.

**3.2** Es responsabilidad de la Jefatura de Laboratorio de Control de Calidad verificar que se lleven a cabo las actividades descritas en este procedimiento.

**3.3** Es responsabilidad del Supervisor de Área de Microbiología coordinar las actividades y llevar a cabo el monitoreo de superficies, así como de informar y de capacitar al personal para llevar a cabo el monitoreo de superficies.

**3.4** Es responsabilidad de la Jefatura de Producción coordinar las actividades, así como de informar y de capacitar al personal en relación a su participación en el monitoreo.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**4. GLOSARIO:**

<b>Palabra / Término</b>	<b>Definición</b>
Área Limpia	Área diseñada, construida y mantenida con el objeto de tener dentro de límites el número de partículas viables y no viables en superficies y medio ambiente.
Área Aséptica	Zona comprendida dentro de un área limpia, diseñada y construida para minimizar la contaminación por partículas viables y no viables, manteniéndola dentro de límites preestablecidos.
Área Crítica Aséptica	Zona dentro del área aséptica en la cual el producto, los recipientes y/o los dispositivos de cierre esterilizados, están expuestos al medio ambiente
Partículas Viables	Cualquier partícula que bajo condiciones ambientales apropiadas puede reproducirse.
Biocarga	Concentración de UFC presentes en un elemento determinado.
Contaminación	Presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables.
Placas RODAC	Placas de un determinado tamaño que contienen un medio específico para un fin determinado.

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>AUTORIZÓ</b>
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**5. DESARROLLO DEL PROCESO:**

**Generalidades.**

El monitoreo de superficies se efectúa para evaluar los procesos de sanitización que se realiza después de la limpieza en áreas y equipos de fabricación, esta evaluación se lleva al cabo por medio de placas de contacto tipo Rodac y el uso de hisopos.

**5.2 Monitoreo de Superficies con Hisopos.**

Esta forma de muestreo se recomienda para superficies irregulares y especialmente para equipo de fabricación.

**5.2.1** Preparar la cantidad suficiente de los medios Agar Soya Trypticaseína (ATS) y Agar dextrosa Sabouraud (ADS) para la siembra de las muestras recolectadas en el monitoreo hisopos conforme a “Preparación de Medios de Cultivo” GCC-PNO-JLA-09.

**5.2.2** Preparar tubos suficientes para el muestreo conteniendo 10 mL de solución salina al 0.1% con Tween 80 como neutralizador de los agentes de limpieza y sanitizantes.

**5.2.3** Identificar cada tubo con el código del área y lugar de muestreo.

**5.2.4** Llevar al área donde se llevara a cabo el monitoreo la cantidad suficiente de hisopos estériles

**5.2.5** Para iniciar el muestreo humedecer un hisopo estéril en la solución salina al 0.1% con Tween 80.

**5.2.6** Eliminar el exceso de solución mediante presión del hisopo contra la pared del tubo.

**5.2.7** Frotar en varias direcciones sobre la superficie a monitorear, delimitada por un marco a plantilla estéril de acero inoxidable de 25 cm<sup>2</sup>.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**5.2.8** Transferir las muestras al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento. En caso de que no se procesen las muestras en el transcurso de la siguiente hora, se deben almacenar en refrigeración.

**5.2.9** Agitar los tubos en un vortex durante 15 a 20 seg.

**5.2.10** En forma aséptica, transferir 1.0 mL de la solución del tubo a una placa Petri estéril identificada con el número del tubo correspondiente, adicionar aproximadamente 15 mL de Agar de Soya Trypticaseína (AST). Dejar solidificar el Agar e incubar en forma invertida durante 48 horas a  $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ .

**5.2.11** En forma aséptica transferir 1.0 mL de la solución del tubo a una placa Petri estéril identificada con el número del tubo correspondiente, adicionar aproximadamente 15 mL de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Dejar solidificar el Agar e incubar en forma invertida de 5-7 días a  $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ .

**5.2.12** Como control negativo en el Laboratorio de Microbiología bajo condiciones asépticas colocar un hisopo estéril en el interior de un tubo con 10 mL de solución salina al 1.0 % con Tween 80 estéril. Realizar las mismas operaciones como se indica en los puntos 5.2.10 y 5.2.11

**5.2.13** Contar y registrar el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por placa en el formato GCC-PNO-JLA-46/F1.

**5.3 Monitoreo de Superficies por Placas de Contacto RODAC.**

Esta forma de monitoreo se recomienda para superficies regulares como pisos, paredes, techos, puertas.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**5.3.1** Se emplearán placas de contacto tipo RODAC con medio Agar de Soya Trypticaseína ATS y Agar Dextrosa Sabouraud ADS.

**5.3.2** Identificar cada placa de acuerdo al área y al sitio a monitorear (puerta, pared, piso, etc.)

**5.3.3** Abrir las placas RODAC por la parte que contiene el medio de cultivo, tocar con el medio de cultivo el sitio señalado, retirar y cerrar las placas.

**5.3.4** Como control negativo se debe incubar una placa que no se haya abierto.

**5.3.5** Una vez muestreado, transferir las muestras al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento.

**5.3.6** Incubar las placas en forma invertida de Agar de Soya Trypticaseína AST a  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  durante 48 horas y las placas de Agar Dextrosa Sabouraud ADS a  $22.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  durante 5-7 días. Inspeccionar cada placa, contar y registrar el número de UFC por placa en el formato GCC-PNO-JLA-46/F2.

**5.4 Frecuencia de monitoreo.**

En las siguientes tablas se presentan las frecuencias y los criterios de aceptación para monitoreo de superficies empleando, tanto hisopos como placas de contacto RODAC.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

<b>FRECUENCIA DE MONITOREO</b>	
<b>CLASIFICACIÓN DE ÁREA</b>	<b>FRECUENCIA</b>
Áreas Críticas Asépticas de Microbiología. Clase 100 bajo flujo unidireccional.	Después de la limpieza y sanitización
Áreas Asépticas de Microbiología. Clase 10,000 fuera de flujo unidireccional.	Cada 15 días y posterior a la limpieza y sanitización
Áreas y quipos de fabricación. Clase 100, 000	Después de terminado un producto posterior a la limpieza y sanitización de la misma.

<b>CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA MONITOREO DE ÁREAS Y DE EQUIPOS POR HISOPADO.</b>				
<b>ÁREA: EQUIPO Y ACCESORIOS</b>	<b>LIMITE DE ALERTA</b>		<b>LIMITE DE ACCION</b>	
	<b>AST Por cada 25 cm<sup>2</sup></b>	<b>ADS Por cada 25 cm<sup>2</sup></b>	<b>AST Por cada 25 cm<sup>2</sup></b>	<b>ADS Por cada 25 cm<sup>2</sup></b>
Áreas Críticas Asépticas de Microbiología. Clase 100 bajo flujo unidireccional.	Máximo 2	Máximo 1	Máximo 3	Máximo 2
Áreas Asépticas de Microbiología. Clase 10,000 fuera de flujo unidireccional.	Máximo 5	Máximo 3	Máximo 10	Máximo 5
Áreas y quipos de fabricación. Clase 100, 000	Máximo 5	Máximo 3	Máximo 10	Máximo 5

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>AUTORIZÓ</b>
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

<b>CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA MONITOREO DE SUPERFICIES PLACAS RODAC</b>				
CLASIFICACION DE ÁREA	LIMITE DE ALERTA (UFC/PLACA)		LIMITE DE ACCION (UFC/ PLACA)	
	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos
Áreas Críticas Asépticas de Microbiología. Clase 100 bajo flujo unidireccional.	Máximo 2	Máximo 1	Máximo 3	Máximo 2
Áreas Asépticas de Microbiología. Clase 10,000 fuera de flujo unidireccional.	Máximo 10	Máximo 5	Máximo 20	Máximo 8
Áreas y quipos de fabricación. Clase 100, 000	Máximo 25	Máximo 5	Máximo 30	Máximo 8

## 6 DOCUMENTACION:

- 6.1 Formato de Reporte de Hisopos GCC-PNO-JLA-46/F1.
- 6.2 Formato de Reporte de Placas Rodac GCC-PNO-JLA-46/F2.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- 7.1 NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica Dedicados a la Fabricación de Medicamentos.
- 7.2 Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program. Technical Report No. 13 PDA Environmental Task Force. Vol. 44, Supplement 1990.
- 7.3 Agalloco, J. Qualification and Validation of Environmental Control Systems. PDA Journal of Pharmaceutical Sciences & Technology, Vol. 50, No. 5 / September - October 1996.
- 7.4 Committee of Microbial Purity Validation and Environmental Monitoring of Aseptic Processing. PDA Journal of Parenteral Sciences & Technology, Vol. 44, No. 5 / September - October 1990

**8. REGISTRO DE CAMBIOS:**

<b>Razón del cambio</b>	<b>Pág.</b>	<b>Elaboró</b>	<b>Autorizó</b>	<b>Fecha aplicación</b>	<b>de</b>	<b>Próxima revisión</b>
NUEVO		J. Medina		Octubre/06		ENERO/08

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>AUTORIZÓ</b>
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**9. CONTROL DE LA DISTRIBUCIÓN.**

<b>Copia No.</b>	<b>Recibió (Nombre y firma)</b>	<b>Departamento</b>	<b>Fecha</b>
10		Documentación	
13		Producción	
15		Microbiología	

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>AUTORIZÓ</b>
<b>Firma/Fecha</b>	<b>Firma/Fecha</b>	<b>Firma/Fecha</b>
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario



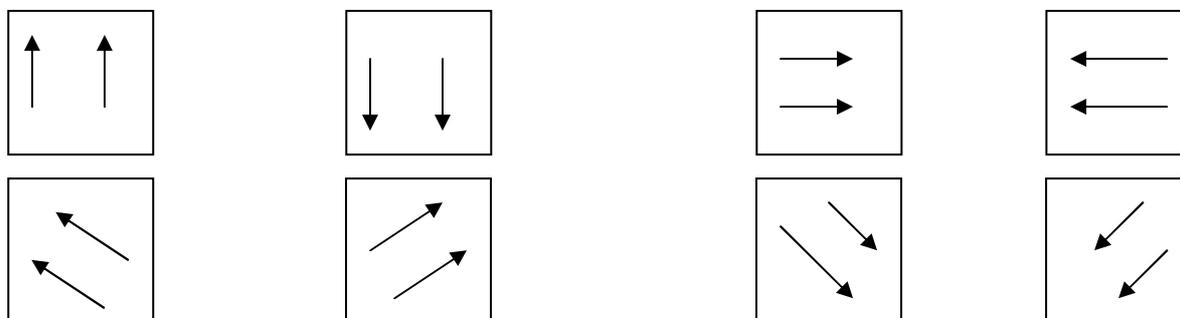


Analista	Jefe de Laboratorio	Responsable Sanitario
<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>		<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>
<b>TITULO DE DOCUMENTO:</b> Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización.	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-46</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**DIAGRAMA 1**

Diagrama de direcciones para el monitoreo de hisopos.

El presente diagrama muestra las direcciones para el frotamiento de torundas en la superficie a muestrear, y que se encuentra delimitada por un morco o plantilla de acero inoxidable de 25 cm<sup>2</sup>, humedecidas previamente en una solución,



ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez	Imay Sepúlveda Toledo	Gloria Aragón Merino

Analista	Jefe de Laboratorio	Responsable Sanitario
<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN No 2

# Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.

### 1. OBJETIVO:

**1.1** Asegurar el correcto manejo y aplicación de las soluciones sanitizantes empleadas en el proceso de sanitización de la planta farmacéutica.

**1.2** Establecer la rotación y frecuencia en la que serán empleados las soluciones sanitizantes en las diferentes áreas y equipos del laboratorio.

### 2. ALCANCE:

**2.1** Este procedimiento aplica a todas las soluciones sanitizantes empleadas en el proceso de sanitización ( Hill-Phene II al 1%, Citricidal al 1%, Alcohol Isopropílico al 70%, Alcohol Etilico al 70% y Cloruro de Benzalconio 1.0 % ) en el la planta farmacéutica.

**2.2** Este procedimiento aplica cada vez que se prepare una solución sanitizante.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez	Imay Sepúlveda Toledo	Gloria Aragón Merino

Analista	Jefe de Laboratorio	Responsable Sanitario
<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>		<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**3. RESPONSABILIDADES:**

**3.1** Es responsabilidad de la Jefatura de Laboratorio de Control de Calidad difundir y verificar la aplicación de este Procedimiento.

**3.2** Es responsabilidad del supervisor del Área de Microbiología dar seguimiento y cumplir con lo especificado en este procedimiento.

**3.3** Es responsabilidad de los analistas del Área de Microbiología la correcta aplicación de este procedimiento.

**3.4** Es responsabilidad de la jefatura de Producción difundir y verificar la correcta aplicación de este procedimiento.

**3.5** Es responsabilidad de la jefatura de Almacén de Materia Prima difundir y verificar la correcta aplicación de este procedimiento.

**3.6** Es responsabilidad del personal operativo de las áreas de Producción y Almacén de Materia Prima:

**3.6.1** Solicitar al área de Microbiología el volumen requerido de sanitizante.

**3.6.2** Notificar al área de Microbiología cuando haya concluido la sanitización del área, devolviendo la solución sanitizante si la hubiera.

**3.6.3** Solicitar al área de Microbiología la exposición de placas de contacto para verificar la efectividad del sanitizante.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

#### 4. GLOSARIO

<b>Palabra/Término</b>	<b>Definición</b>
Limpieza	Eliminación de partículas no viables.
Partículas viables.	Cualquier partícula que bajo condiciones ambientales apropiadas puede reproducirse.
Sanitización.	Eliminación de partículas viables por medio de agentes especiales posterior a la actividad de limpieza.
Contaminación	Presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables.
Sanitizante	Sustancias que reducen la biocarga presente de microorganismos presentes en cualquier ambiente u objeto
Citricidal	Químicamente conocido como un complejo difenol hidroxibenceno, es extraído a partir de las semillas y pulpas de la toronja. Está compuesto por un 60% de extracto cítrico y 40% de glicerina vegetal. Es un bactericida, fungicida, antiviral y antiparasitario de amplio espectro extremadamente potente, con nula toxicidad para los humanos.
Hill-Phene II	Es un compuesto fenólico en presentación comercial compuesto por 6.49% de orto-fenilfenato de sodio y 6.5% de orto-bencil-para-clorofenato de sodio. Es un excelente bactericida, fungicida y antiviral.
Cloruro de Benzalconio	Es un compuesto cuaternario de amonio, en cuya presentación comercial es líquida a una concentración del 10%. Es un excelente bactericida, antifúngico y antiviral.

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>AUTORIZÓ</b>
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez	Imay Sepúlveda Toledo	Gloria Aragón Merino

Analista	Jefe de Laboratorio	Responsable Sanitario
<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

### 5. GENERALIDADES.

Para el adecuado funcionamiento de un cuarto limpio, es necesario realizar periódicamente sanitizaciones que ayuden a preservar las condiciones asépticas en las cuales se operan los diferentes procesos. Una sanitización adecuada debe ser realizada de tal manera que proteja debidamente todas las superficies del cuarto limpio, las superficies externas de los equipos, así mismo todo aquel material de trabajo que se encuentre dentro del área. Esta sanitización periódica va enfocada al ataque de los posibles microorganismos que se puedan encontrar depositados o adheridos a las superficies antes mencionadas. La sanitización se realiza utilizando agentes de diferente composición química, como sales cuaternarias de amonio, compuestos clorados, ó compuesto fenólicos, que posean siempre un poder bactericida demostrado. Dado que muchos microorganismos pueden crear resistencia al ataque de estos sanitizantes, es recomendable la rotación de los mismos, esta rotación usará alternadamente agentes químicos que utilicen radicales químicos distintos para ejercer su acción, ya que esto dificulta la aparición de microorganismos resistentes. Muchos de los agentes sanitizantes se presentan en forma líquida por lo que se pueden aplicar por frotamiento. Si éste es el caso, se tendrá especial cuidado que las telas con que sean aplicados no liberen partículas que puedan contaminar el medio ambiente, a las soluciones sanitizantes se les debe determinar su actividad antimicrobiana por la prueba de reto microbiano o la de coeficiente fenólico para verificar su efectividad en las áreas de producción. Las soluciones sanitizantes y concentraciones que se emplean en las Áreas de Producción y de Almacén de Materia Prima de Novag Infancia S.A. de C.V. son indicadas a continuación en el orden en que deben ser utilizadas.

SOLUCIÓN SANITIZANTE	CONCENTRACIÓN
Alcohol etílico	70 % v/v
Hill-Phene II	1.0% v/v
Alcohol Isopropílico	70 % v/v
Cloruro de Benzalconio	1.0% v/v
Citricidal	1.0% v/v

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez	Imay Sepúlveda Toledo	Gloria Aragón Merino

Analista	Jefe de Laboratorio	Responsable Sanitario
<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

## 5.2 PROCEDIMIENTO

**NOTA:** para la preparación de las soluciones sanitizantes ver el Anexo 1.

- 5.2.1** Todos los lunes, como primera actividad en el laboratorio de microbiología será la preparación de la solución sanitizante.
- 5.2.2** Preparar la solución sanitizante según corresponda el programa de rotación, y de acuerdo al anexo 1.
- 5.2.3** Preparar el volumen de sanitizante de acuerdo a la cantidad solicitada por el Departamento de Almacén de Materia Prima y/o el Departamento de Producción.
- 5.2.4** Colocar la solución sanitizante preparada en envases con tapa de rosca limpios y secos, debidamente rotulados con: nombre de la solución sanitizante, concentración, fecha, nombre de quien prepara y número de control (corresponde al número consecutivo que le corresponda al ser registrado en la bitácora MC-6).
- 5.2.5** Registrar en la bitácora MC-6 “Preparación y control de sanitizantes” los siguientes datos: fecha de preparación, hora de preparación, nombre de la solución sanitizante, concentración, cantidad preparada, iniciales de quien preparó, número de control, nombre del solicitante, fecha de entrega, hora de entrega, persona que entregó, persona que recibió. Regresar el sobrante de los sanitizantes al Área de Microbiología en caso de haberlo.

## 6. DOCUMENTACION:

- 6.1** “Preparación y control de sanitizantes” Bitácora MC-6
- 6.2** “Programa de rotación de sanitizantes” GCC-PNO-JLA/Pr-1.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez	Imay Sepúlveda Toledo	Gloria Aragón Merino

Analista	Jefe de Laboratorio	Responsable Sanitario
<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>		<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:**

- 7.1 NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica Dedicados a la Fabricación de Medicamentos.
- 7.2 Información del sanitizante correspondiente, proporcionados por el proveedor.

**8. REGISTRO DE CAMBIOS:**

Razón del cambio	Pág.	Elaboró	Autorizó	Fecha de aplicación	Próxima revisión
Nuevo		J.Luis Medina P.		Octubre/06	Octubre/08
Anexo de programa de rotación de sanitizantes y nombre del documento		J.Luis Medina P.		octubre/06	Octubre /08

**9. CONTROL DE LA DISTRIBUCIÓN**

Copia No.	Recibió (Nombre y firma)	Departamento	Fecha
10		Documentación	
13		Producción	
14		Almacén de M.P.	
15		Microbiología	

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**PROCEDIMIENTO No 1**

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES SANITIZANTES.**

**ALCOHOL ETÍLICO 70 % V/V.**

Con la ayuda de una probeta graduada de 1000 mL medir con exactitud 729 mL de Alcohol Etílico al 96% y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

**HIL-PHENE II AL 1 % V/V.**

Con la ayuda de una pipeta graduada de 10 mL medir con exactitud 7.8 mL de la solución concentrada de Hill-Phene II y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

**ALCOHOL ISOPROPÍLICO AL 70 % V/V.**

Con la ayuda de una probeta graduada de 1000 mL medir con exactitud 700 mL de alcohol Isopropílico puro y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, afora con agua deionizada y mezclar.

**CLORURO DE BENZALCONIO AL 1 % V/V.**

Con la ayuda de una probeta graduada de 100 mL medir con exactitud 100 mL de la solución al 10% de Cloruro de Benzalconio y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

**CITRICIDAL AL 1 % V/V.**

Con la ayuda de una pipeta graduada de 25 mL medir con exactitud 17 mL de la solución concentrada de Citricidal y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

*"Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Sanitizantes"*

<b>NOVAG INFANCIA S.A. DE C.V.</b>	<b>Procedimiento Normalizado de Operación</b>	
<b>TITULO DE DOCUMENTO: Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes.</b>	<b>Página</b>	
	<b>Código</b>	<b>GCC-PNO-JLA-47</b>
	<b>Revisión</b>	<b>00</b>
	<b>Fecha de Emisión</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de aplicación</b>	<b>Octubre/2006</b>
	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Octubre/2008</b>

**PROGRAMA DE ROTACIÓN DE SANITIZANTES GCC-PNO-JLA-36/Pr-1**

**AÑO:**                                  **MES:**                                  **ÁREA:**

(DÍAS)	SANITIZANTE EN USO.					OBSERVACIONES
	HILL-PHENE II	ALCOHOL ISOPROPÍLICO 70%	CLORURO DE BENZALCONIO 1%	CITRICIDAL 1%	ALCOHOL ETÍLICO 70%	
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

ELABORÓ	REVISÓ	AUTORIZÓ
Firma/Fecha	Firma/Fecha	Firma/Fecha
José Luis medina Pérez Analista	Imay Sepúlveda Toledo Jefe de Laboratorio	Gloria Aragón Merino Responsable Sanitario

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LOS PNO'S.**

Dentro de la industria farmacéutica la documentación es de suma importancia, dentro de las áreas de producción, almacenes, laboratorios, oficinas, pues si algún proceso, técnica, método o simplemente una estrategia de algo no se encuentra documentado esto oficialmente no tendrá validez, en la industria farmacéutica se maneja mucho el lema “ Lo que no está escrito NO esta hecho”, con justa razón muy bien dicho esté lema, pues hay que tener en cuenta que lo que es obvio para algunas personas, no es claro para muchas otras, de ahí la importancia de la documentación, pues con esta se forma un entorno general de las cosas. Con la elaboración de estos procedimientos normalizados de operación se establecen responsabilidades de quien, como, cuando, donde y con que se debe de realizar, procesos, técnicas métodos, etc. el PNO “Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización” ayudara precisamente a mantener un orden documentado en la evaluación de dicho proceso de la planta farmacéutica pues este Procedimiento normalizado de operación establece los lineamientos que se deben de llevar a cabo para el proceso de sanitización, lo mismo sucede con el PNO “Preparación, control y rotación de soluciones sanitizantes” con este documento se tendrá un orden documentado de la preparación, rol y control de dichas soluciones, a si pues toda persona que requiera soluciones sanitizantes se deberá apegar a la descrito en el PNO, así pues cada jefatura se deberá de encargar de difundir la información de la aplicación de estos PNO's, con estos documentos cualquier persona que la labore en la empresa deberá llevar a cabo lo establecido en estos, los procedimientos normalizados de operación elaborados deberán ser revisados y actualizados por personal correspondiente. Los responsables de la elaboración de los PNO's se encargaran de capacitar al personal que ya se encuentre laborando y al personal de nuevo ingreso para la aplicación de estos documentos. Con la elaboración de estos procedimientos se tendrán registros documentados oficiales para el laboratorio y autoridades sanitarias de los procesos de sanitización y control de las soluciones sanitizantes.

Tabla No 2

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “in situ” EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE HISOPADO. (antes de sanitizar con alcohol etílico al 70%)**

Tanque	No 1 de 1500 L			No 2 de 1500 L			No 3 de 1000 L			No 4 de 1000 L		
	UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>		
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	1	0	1	1	0	1	5	1	6	1	1	2
Mitad derecha Hisopado	2	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	1
Superior Derecha Hisopado	1	0	1	1	0	1	1	0	1	2	0	2
Superior Izquierda Hisopado	1	0	1	1	1	2	3	1	4	3	1	4
Tapa Hisopado	3	1	4	2	3	5	1	2	3	1	1	2
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		9	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		11	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		15	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		11

Tabla No 3

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “*in situ*” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	2	0	2
Pared derecha Placa Rodac	6	2	8
Piso Placa Rodac	5	7	12
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en paredes y piso		22

Los resultados que se obtienen y se muestran en las tablas 2 y 3 después de procesar las muestras en el laboratorio de microbiología de esta evaluación previa al proceso de sanitización en área y equipos, demuestran que la carga microbiana se encuentra presente a un después de la limpieza, lo cual indica que es necesario dicho proceso, pues si este no se realiza el producto que sea fabricado tendrá una alta probabilidad de contaminación microbiana. Si bien estos resultados obtenidos en esta primera etapa demuestran que la carga microbiana esta presente en general en todos los puntos de muestreo, no se puede decir que se encuentra dentro o fuera de límites, pues no existen datos documentados de evaluación previa a la sanitización, solo se contaba con registro que ponían de manifiesto la utilización de soluciones sanitizantes en áreas y equipos, lo que demostró la necesidad de llevar a cabo este trabajo, también al realizar esta evaluación se ha establecido la documentación apropiada para reportar todo el proceso de sanitización.

Tabla No 4

**RESULTADOS “*in situ*” DE CARGA MICROBIANA DESPUÉS DE SANITIZAR CON ALCOHOL ETÍLICO AL 70 % EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN POR EL MÉTODO DE HISOPADO**

<b>Tanque</b>	<b>No 1 de 1500 L</b>			<b>No 2 de 1500 L</b>			<b>No 3 de 1000 L</b>			<b>No 4 de 1000 L</b>		
Sitio y tipo de muestreo	UFC/25cm <sup>2</sup>											
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mitad derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tapa Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0

Tabla No 5

**RESULTADOS DE CARGA MICROBIANA “*in situ*” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	0	0	0
Pared derecha Placa Rodac	0	0	0
Piso Placa Rodac	0	0	0
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en paredes y piso		0

Los resultados que se muestran en las tablas 4 y 5 y que son obtenidos en la evaluación de carga microbiana “*in situ*” después de sanitizar con alcohol etílico al 70% son resultados 100% favorables, pues de la carga inicial que se tenía, después del proceso de sanitización que se realizó tanto en tanques de almacenamiento como en paredes y piso, se demuestra que esta solución sanitizante tiene poder como agente que dañan la membrana celular bacteriana de los microorganismos, y agente que desnaturalizan proteínas, por lo tanto es una solución confiable que puede ser utilizada en el proceso de sanitización, esta evaluación que se realiza “*in situ*” es de mucha importancia, pues con esta evaluación se tendrá la absoluta certeza de que las soluciones sanitizantes cumplen con su objetivo, para ello los operarios encargados del área deben ejecutar perfectamente dicho proceso, pues como se demostró en la evaluación de carga inicial microbiana, la carga microbiológica esta presente en el entorno de fabricación y equipos a un después de la limpieza, esta evaluación “*in situ*” se deberá llevar a cabo como lo especifica el PNO correspondiente, pues así se podrán tomar acciones preventivas o correctivas del proceso de sanitización.

Tabla No 6

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “in situ” EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE HÍSOPADO. (antes de sanitizar con Hill-Phene II 1.0%)**

Tanque	No 1 de 1500 L			No 2 de 1500 L			No 3 de 1000 L			No 4 de 1000 L		
	UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>		
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	4	0	4	5	0	5	2	0	2	1	0	1
Mitad derecha Hisopado	1	0	1	2	0	2	1	2	3	1	1	2
Superior Derecha Hisopado	2	0	2	1	0	1	4	1	5	1	0	1
Superior Izquierda Hisopado	1	0	1	3	1	4	3	0	3	1	1	2
Tapa Hisopado	1	1	2	6	1	7	2	1	3	2	3	5
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		10	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		19	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		16	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		11

Tabla No 7

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “*in situ*” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	6	4	10
Pared derecha Placa Rodac	4	4	8
Piso Placa Rodac	8	2	10
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en paredes y piso		28

Los resultados que se obtienen y se muestran en las tablas 6 y 7 después de procesar las muestras en el laboratorio de microbiología de esta evaluación previa al proceso de sanitización en área y equipos, demuestran que la carga microbiana se encuentra presente a un después de la limpieza, lo cual indica que es necesario dicho proceso, pues si este no se realiza el producto que sea fabricado tendrá una alta probabilidad de contaminación microbiana. Si bien estos resultados obtenidos en esta primera etapa demuestran que la carga microbiana esta presente en general en todos los puntos de muestreo, no se puede decir que se encuentra dentro o fuera de límites, pues no existen datos documentados de evaluación previa a la sanitización, solo se contaba con registro que ponían de manifiesto la utilización de soluciones sanitizantes en áreas y equipos, lo que demostró la necesidad de llevar a cabo este trabajo, también al realizar esta evaluación se ha establecido la documentación apropiada para reportar todo el proceso de sanitización.

Tabla No 8

**RESULTADOS “in situ” DE CARGA MICROBIANA DESPUÉS DE SANITIZAR CON HILL-PHENE II 1.0 % EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN POR EL MÉTODO DE HISOPADO**

<b>Tanque</b>	<b>No 1 de 1500 L</b>			<b>No 2 de 1500 L</b>			<b>No 3 de 1000 L</b>			<b>No 4 de 1000 L</b>		
Sitio y tipo de muestreo	UFC/25cm <sup>2</sup>											
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mitad derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tapa Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0

Tabla No 9

**RESULTADOS DE CARGA MICROBIANA “*in situ*” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	0	0	0
Pared derecha Placa Rodac	0	0	0
Piso Placa Rodac	0	0	0
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en paredes y piso		0

Los resultados que se muestran en las tablas 8 y 9 y que son obtenidos en la evaluación de carga microbiana “*in situ*” después de sanitizar con Hill-Phene II 1% son resultados 100% favorables, pues de la carga inicial que se tenía, después del proceso de sanitización que se realizó tanto en tanques de almacenamiento como en paredes y piso, se demuestra que esta solución sanitizante tiene poder como agente que dañan la membrana celular bacteriana de los microorganismos, y agente que desnaturalizan proteínas, por lo tanto es una solución confiable que puede ser utilizada en el proceso de sanitización, esta evaluación que se realiza “*in situ*” es de mucha importancia, pues con esta evaluación se tendrá la absoluta certeza de que las soluciones sanitizantes cumplen con su objetivo, para ello los operarios encargados del área deben ejecutar perfectamente dicho proceso, pues como se demostró en la evaluación de carga inicial microbiana, la carga microbiológica esta presente en el entorno de fabricación y equipos a un después de la limpieza, esta evaluación “*in situ*” se deberá llevar a cabo como lo especifica el PNO correspondiente, pues así se podrán tomar acciones preventivas o correctivas del proceso de sanitización.

Tabla No 10

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “in situ” EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE HÍSOPADO. (antes de sanitizar con Cloruro de benzalconio 1.0%)**

Tanque	No 1 de 1500 L			No 2 de 1500 L			No 3 de 1000 L			No 4 de 1000 L		
	UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>		
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	1	0	1	6	0	6	1	2	3	1	0	1
Mitad derecha Hisopado	2	1	3	1	0	1	1	3	4	1	1	2
Superior Derecha Hisopado	4	0	4	3	0	3	4	1	5	1	0	1
Superior Izquierda Hisopado	1	1	2	0	1	1	0	1	1	1	1	2
Tapa Hisopado	2	1	3	1	1	2	2	1	3	2	3	5
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		13	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		13	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		16	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		11

Tabla No 11

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “in situ” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	1	2	3
Pared derecha Placa Rodac	1	4	5
Piso Placa Rodac	3	3	6
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en paredes y piso		14

Los resultados que se obtienen y se muestran en las tablas 10 y 11 después de procesar las muestras en el laboratorio de microbiología de esta evaluación previa al proceso de sanitización en área y equipos, demuestran que la carga microbiana se encuentra presente a un después de la limpieza, lo cual indica que es necesario dicho proceso, pues si este no se realiza el producto que sea fabricado tendrá una alta probabilidad de contaminación microbiana. Si bien estos resultados obtenidos en esta primera etapa demuestran que la carga microbiana esta presente en general en todos los puntos de muestreo, no se puede decir que se encuentra dentro o fuera de límites, pues no existen datos documentados de evaluación previa a la sanitización, solo se contaba con registro que ponían de manifiesto la utilización de soluciones sanitizantes en áreas y equipos, lo que demostró la necesidad de llevar a cabo este trabajo, también al realizar esta evaluación se ha establecido la documentación apropiada para reportar todo el proceso de sanitización.

Tabla No 12

**RESULTADOS “in situ” DE CARGA MICROBIANA DESPUÉS DE SANITIZAR CON CLORURO DE BENZALCONIO 1.0 % EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN POR EL MÉTODO DE HISOPADO**

<b>Tanque</b>	<b>No 1 de 1500 L</b>			<b>No 2 de 1500 L</b>			<b>No 3 de 1000 L</b>			<b>No 4 de 1000 L</b>		
Sitio y tipo de muestreo	UFC/25cm <sup>2</sup>											
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mitad derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tapa Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0

Tabla No 13

**RESULTADOS DE CARGA MICROBIANA “*in situ*” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	0	0	0
Pared derecha Placa Rodac	0	0	0
Piso Placa Rodac	0	0	0
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en paredes y piso		0

Los resultados que se muestran en las tablas 12 y 13 y que son obtenidos en la evaluación de carga microbiana “*in situ*” después de sanitizar con Cloruro de Benzalconio 1% son resultados 100% favorables, pues de la carga inicial que se tenía, después del proceso de sanitización que se realizó tanto en tanques de almacenamiento como en paredes y piso, se demuestra que esta solución sanitizante tiene poder como agente que dañan la membrana celular bacteriana de los microorganismos, y agente que desnaturalizan proteínas, por lo tanto es una solución confiable que puede ser utilizada en el proceso de sanitización, esta evaluación que se realiza “*in situ*” es de mucha importancia, pues con esta evaluación se tendrá la absoluta certeza de que las soluciones sanitizantes cumplen con su objetivo, para ello los operarios encargados del área deben ejecutar perfectamente dicho proceso, pues como se demostró en la evaluación de carga inicial microbiana, la carga microbiológica esta presente en el entorno de fabricación y equipos a un después de la limpieza, esta evaluación “*in situ*” se deberá llevar a cabo como lo especifica el PNO correspondiente, pues así se podrán tomar acciones preventivas o correctivas del proceso de sanitización.

Tabla No 14

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “in situ” EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE HÍSOPADO. (antes de sanitizar con alcohol isopropílico 70%)**

Tanque	No 1 de 1500 L			No 2 de 1500 L			No 3 de 1000 L			No 4 de 1000 L		
	UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>			UFC/25cm <sup>2</sup>		
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	1	0	1	3	1	4	2	2	4	5	1	6
Mitad derecha Hisopado	1	1	2	1	0	1	4	1	5	1	1	2
Superior Derecha Hisopado	1	0	1	8	0	8	0	0	0	4	2	6
Superior Izquierda Hisopado	1	1	2	2	1	3	1	1	2	1	0	1
Tapa Hisopado	2	0	2	3	2	5	3	0	3	2	0	2
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		8	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		21	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		14	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		17

Tabla No 15

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “in situ” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	7	3	10
Pared derecha Placa Rodac	5	3	8
Piso Placa Rodac	4	2	6
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en paredes y piso		24

Los resultados que se obtienen y se muestran en las tablas 14 y 15 después de procesar las muestras en el laboratorio de microbiología de esta evaluación previa al proceso de sanitización en área y equipos, demuestran que la carga microbiana se encuentra presente a un después de la limpieza, lo cual indica que es necesario dicho proceso, pues si este no se realiza el producto que sea fabricado tendrá una alta probabilidad de contaminación microbiana. Si bien estos resultados obtenidos en esta primera etapa demuestran que la carga microbiana esta presente en general en todos los puntos de muestreo, no se puede decir que se encuentra dentro o fuera de límites, pues no existen datos documentados de evaluación previa a la sanitización, solo se contaba con registro que ponían de manifiesto la utilización de soluciones sanitizantes en áreas y equipos, lo que demostró la necesidad de llevar a cabo este trabajo, también al realizar esta evaluación se ha establecido la documentación apropiada para reportar todo el proceso de sanitización.

Tabla No 16

**RESULTADOS “in situ” DE CARGA MICROBIANA DESPUÉS DE SANITIZAR CON ALCOHOL ISOPROPÍLICO 70 % EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN POR EL MÉTODO DE HISOPADO**

<b>Tanque</b>	<b>No 1 de 1500 L</b>			<b>No 2 de 1500 L</b>			<b>No 3 de 1000 L</b>			<b>No 4 de 1000 L</b>		
Sitio y tipo de muestreo	UFC/25cm <sup>2</sup>											
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mitad derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tapa Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0

Tabla No 17

**RESULTADOS DE CARGA MICROBIANA “*in situ*” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	0	0	0
Pared derecha Placa Rodac	0	0	0
Piso Placa Rodac	0	0	0
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en paredes y piso		0

Los resultados que se muestran en las tablas 16 y 17 y que son obtenidos en la evaluación de carga microbiana “*in situ*” después de sanitizar con alcohol Isopropílico al 70% son resultados 100% favorables, pues de la carga inicial que se tenía, después del proceso de sanitización que se realizó tanto en tanques de almacenamiento como en paredes y piso, se demuestra que esta solución sanitizante tiene poder como agente que dañan la membrana celular bacteriana de los microorganismos, y agente que desnaturalizan proteínas, por lo tanto es una solución confiable que puede ser utilizada en el proceso de sanitización, esta evaluación que se realiza “*in situ*” es de mucha importancia, pues con esta evaluación se tendrá la absoluta certeza de que las soluciones sanitizantes cumplen con su objetivo, para ello los operarios encargados del área deben ejecutar perfectamente dicho proceso, pues como se demostró en la evaluación de carga inicial microbiana, la carga microbiológica esta presente en el entorno de fabricación y equipos a un después de la limpieza, esta evaluación “*in situ*” se deberá llevar a cabo como lo especifica el PNO correspondiente, pues así se podrán tomar acciones preventivas o correctivas del proceso de sanitización.

Tabla No 18

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “in situ” EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE HÍSOPADO. (antes de sanitizar con Citricidal 1.0%)**

<b>Tanque</b>	<b>No 1 de 1500 L</b>			<b>No 2 de 1500 L</b>			<b>No 3 de 1000 L</b>			<b>No 4 de 1000 L</b>		
Sitio y tipo de muestreo	UFC/25cm <sup>2</sup>											
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	1	0	1	5	1	6	7	0	7	1	2	3
Mitad derecha Hisopado	1	1	2	3	1	4	2	1	3	1	1	2
Superior Derecha Hisopado	1	0	1	0	1	1	0	4	4	0	2	2
Superior Izquierda Hisopado	2	1	3	1	0	1	1	1	2	1	1	2
Tapa Hisopado	2	0	2	6	1	7	1	1	2	2	1	3
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		9	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		19	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		18	Correspondiente al 100 % de carga inicial en el tanque		12

Tabla No 19

**RESULTADOS DE CARGA INICIAL MICROBIANA “*in situ*” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	3	1	4
Pared derecha Placa Rodac	4	2	6
Piso Placa Rodac	2	1	3
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga inicial en paredes y piso		13

Los resultados que se obtienen y se muestran en las tablas 18 y 19 después de procesar las muestras en el laboratorio de microbiología de esta evaluación previa al proceso de sanitización en área y equipos, demuestran que la carga microbiana se encuentra presente a un después de la limpieza, lo cual indica que es necesario dicho proceso, pues si este no se realiza el producto que sea fabricado tendrá una alta probabilidad de contaminación microbiana. Si bien estos resultados obtenidos en esta primera etapa demuestran que la carga microbiana esta presente en general en todos los puntos de muestreo, no se puede decir que se encuentra dentro o fuera de límites, pues no existen datos documentados de evaluación previa a la sanitización, solo se contaba con registro que ponían de manifiesto la utilización de soluciones sanitizantes en áreas y equipos, lo que demostró la necesidad de llevar a cabo este trabajo, también al realizar esta evaluación se ha establecido la documentación apropiada para reportar todo el proceso de sanitización.

Tabla No 20

**RESULTADOS “in situ” DE CARGA MICROBIANA DESPUÉS DE SANITIZAR CON CITRICIDAL 1.0% EN LOS TANQUES DEL ÁREA DE FABRICACIÓN POR EL MÉTODO DE HISOPADO**

<b>Tanque</b>	<b>No 1 de 1500 L</b>			<b>No 2 de 1500 L</b>			<b>No 3 de 1000 L</b>			<b>No 4 de 1000 L</b>		
Sitio y tipo de muestreo	UFC/25cm <sup>2</sup>											
	Agar AST	Agar ADS	Total									
Mitad izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mitad derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Derecha Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superior Izquierda Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tapa Hisopado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de UFC en AST Y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0	Correspondiente al 100 % de carga final en el tanque		0

Tabla No 21

**RESULTADOS DE CARGA MICROBIANA “in situ” EN PAREDES Y PISO DEL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS POR EL MÉTODO DE PLACAS RODAC.**

Sitio y tipo de muestreo	UFC/ Placa Agar AST	UFC/Placa Agar ADS	UFC Total
Pared izquierda Placa Rodac.	0	0	0
Pared derecha Placa Rodac	0	0	0
Piso Placa Rodac	0	0	0
Total de UFC en AST y ADS	Correspondiente al 100 % de carga final en paredes y piso		0

Los resultados que se muestran en las tablas 20 y 21 y que son obtenidos en la evaluación de carga microbiana “*in situ*” después de sanitizar con Citricidal 1% son resultados 100% favorables, pues de la carga inicial que se tenía, después del proceso de sanitización que se realizó tanto en tanques de almacenamiento como en paredes y piso, se demuestra que esta solución sanitizante tiene poder como agente que dañan la membrana celular bacteriana de los microorganismos, y agente que desnaturalizan proteínas, por lo tanto es una solución confiable que puede ser utilizada en el proceso de sanitización, esta evaluación que se realiza “*in situ*” es de mucha importancia, pues con esta evaluación se tendrá la absoluta certeza de que las soluciones sanitizantes cumplen con su objetivo, para ello los operarios encargados del área deben ejecutar perfectamente dicho proceso, pues como se demostró en la evaluación de carga inicial microbiana, la carga microbiológica está presente en el entorno de fabricación y equipos a un después de la limpieza, esta evaluación “*in situ*” se deberá llevar a cabo como lo especifica el PNO correspondiente, pues así se podrán tomar acciones preventivas o correctivas del proceso de sanitización.

Tabla No 22

Resultados de la evaluación *“in vitro”* de las soluciones sanitizantes con *Bacillus cereus ATCC 11778* un tiempo de 30 segundos de exposición, con la concentración habitualmente usada, la prueba se realizo por duplicado.

Dilución	Solución peptonada Control (+) (UFC)		Cloruro de benzalconio 1.0 %		Hill-Phene II 1.0%		Alcohol isopropilico 70%		Citricidal 1.0%		Alcohol etilico 70 %	
			30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)	
10 <sup>-3</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-4</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-5</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-7</sup>	46	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-8</sup>	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-9</sup>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CV=	S=	46	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CV= Cuenta viable para el testigo (+)

S= Células sobrevivientes después de la exposición al sanitizante

Inc.= Unidades formadoras de colonias en determinada dilución

Determinar % de efectividad para cada solución, utilizando CV= 46 y 39, S= 0 y 0. con la siguiente formula: % de efectividad= 100 – (S x 100) / CV

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 46 = 100\%$$

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 39 = 100\%$$

Tabla No 23

Resultados de la evaluación *“in vitro”* de las soluciones sanitizantes con *Escherichia coli ATCC 8739* un tiempo de 30 segundos de exposición, con la concentración habitualmente usada. la prueba se realizo por duplicado.

Dilución	Solución peptonada Control (+) (UFC)		Cloruro de benzalconio 1.0 %		Hill-Phene II 1.0%		Alcohol isopropilico 70%		Citricidal 1.0%		Alcohol etilico 70 %	
			30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)	
10 <sup>-3</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-4</sup>	Inc	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-5</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-7</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-8</sup>	100	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-9</sup>	14	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CV=	S=	100	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CV= Cuenta viable para el testigo (+)

S= Células sobrevivientes después de la exposición al sanitizante

Inc.= Unidades formadoras de colonia en determinada dilución

Determinar % de efectividad para cada solución, utilizando CV= 100 y 88, S= 0 y 0. Con la siguiente formula: % de efectividad = 100 – (S x 100) / CV

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 100 = 100 \%$$

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 88 = 100\%$$

Tabla No 24

Resultados de la evaluación *“in vitro”* de las soluciones sanitizantes con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P en un tiempo de 30 segundos de exposición, con la concentración habitualmente usada, la prueba se realizo por duplicado.

Dilución	Solución peptonada Control (+) (UFC)		Cloruro de benzalconio 1.0 %		Hill-Phene II 1.0%		Alcohol isopropilico 70%		Citricidal 1.0%		Alcohol etílico 70 %	
			30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)	
10 <sup>-3</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-4</sup>	Inc	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-5</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-7</sup>	48	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-8</sup>	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-9</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CV=	S=	48	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CV= Cuenta viable para el testigo (+)

S= Células sobrevivientes después de la exposición al sanitizante

Inc.= Unidades formadoras de colonia en determinada dilución

Determinar % de efectividad para cada solución, utilizando CV= 48 y 33, S= 0 y 0. con la siguiente formula: % de efectividad = 100 – (S x 100) / CV

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 48 = 100\%$$

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 33 = 100\%$$

Tabla No 25

Resultados de la evaluación “in vitro” de las soluciones sanitizantes con *Salmonella typhi* ATCC 6539 en un tiempo de 30 segundos de exposición, con la concentración habitualmente usada, la prueba se realizo por duplicado.

Dilución	Solución peptonada Control (+)		Cloruro de benzalconio 1.0 % (UFC)		Hill-Phene II 1.0%		Alcohol isopropilico 70%		Citricidal 1.0%		Alcohol etílico 70 %	
	(UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)		30 segundos de Exposición. (UFC)	
10 <sup>-3</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-4</sup>	Inc	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-5</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-6</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-7</sup>	Inc.	Inc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-8</sup>	168	172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 <sup>-9</sup>	31	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CV=	S=	168	172	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CV= Cuenta viable para el testigo (+)

S= Células sobrevivientes después de la exposición al sanitizante

Inc.= Unidades formadoras de colonia en determinada dilución

Determinar % de efectividad para cada solución, utilizando CV= 168 y 172, S= 0 y 0. con la siguiente formula: % de efectividad = 100 – (S x 100) / CV

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 168 = 100\%$$

$$\% \text{ de efectividad} = 100 - (0 \times 100) / 172 = 100\%$$

En las tablas 22, 23, 24, y 25 de la evaluación *“in vitro”* de las soluciones sanitizantes ante un grupo específico de microorganismos sugerido en métodos oficiales se pone de manifiesto que las soluciones sanitizantes utilizadas habitualmente en la planta farmacéutica son efectivas, demostrando así su efectividad estas soluciones con su poder germicida, pues cada una de estas soluciones fue retada en un tiempo dado, volumen de inóculo definido, y cepa definida bajo condiciones de ensayo idénticas. Es importante mencionar que esta evaluación es un método estandarizado que pone de manifiesto el poder bactericida de soluciones sanitizantes en el laboratorio, trabajando con cepas conocidas, una concentración de inóculo establecida y condiciones de ensayo idénticas, a demás de la utilización de testigos positivos, cabe mencionar que el problema real no esta dentro de el laboratorio de microbiología, si no en los entornos de fabricación y en los equipos de fabricación, es ahí donde las soluciones sanitizantes deben de ejercer su acción ante la contaminación microbiana que pudiera encontrarse, de aquí la importancia de llevar a cabo también la evaluación de las soluciones sanitizantes *“in situ”* pues ambas pruebas son complementarias, con esto se tendrá la absoluta certeza de que las soluciones sanitizantes que son utilizadas en la planta son efectivas contra microorganismos que puedan estar presentes en entornos de fabricación y equipos, con ello se puede garantizar que cualquier producto que sea fabricado en el laboratorio cumplirá especificaciones microbiológicas requeridas. Es importante mencionar que esta evaluación solo garantiza la limpieza microbiológica en entornos de fabricación, equipos, y utensilios son utilizados en la elaboración de un producto farmacéutico, sin embargo esto no garantiza al 100% que un producto no se pueda contaminar, pues la contaminación microbiológica no solo se puede presentar en equipos y entornos de fabricación si no también en los componentes del producto, los operarios, materiales de empaque y agua, estos factores también deben ser controlados.

## **VI. CONCLUSIONES**

- Los PNO's elaborados en este trabajo ayudarán a mantener el proceso de sanitización perfectamente documentado, como consecuencia de esto, todo material, equipo y entorno de fabricación que se someta a este proceso puede mantenerse en perfectas condiciones microbiológicas. Se generaron dos PNO'S; **“Monitoreo de superficies en áreas de producción y servicios para la evaluación del proceso de sanitización”** y **“Preparación, Control y Rotación de Soluciones Sanitizantes”**.
  
- Se puede establecer que las soluciones sanitizantes a las concentraciones habitualmente utilizadas en el laboratorio cumplen con el objetivo de eliminar **“in situ”** e **“in vitro”** el 99.99% de las bacterias de carga inicial presentes en área, equipos, a demás de una suspensión determinada de microorganismos, previniendo así cualquier contaminación relacionada a equipos y entornos de fabricación.
  
- La disminución de los microorganismos presentes en área y equipo, que se demostró con la prueba **“in situ”** fue similar en ambas formas de muestreo, hisopado y placas de contacto, 0% al valor inicial, por otra parte la evaluación **“in vitro”** es favorable, pues se llega a un 100% de efectividad.
  
- Se deben de tomar acciones correctivas dirigidas a todos los operarios de la planta, que consta del adiestramiento en el proceso de sanitización, con el fin de mantener en condiciones óptimas de carga microbiológica entornos de fabricación y equipos, en cuanto a las soluciones sanitizantes, se puede concluir que no necesitan modificaciones a las concentraciones propuestas.

## ***VII. SUGERENCIAS***

- Capacitar y adiestrar al nuevo personal en el proceso de sanitización.
  
- En el caso de incorporarse nuevos equipos, se deberá llevar a cabo la evaluación de los sanitizantes en dichos equipos.
  
- Deberá cumplirse lo especificado en el PNO “Monitoreo de Superficies en Áreas de Producción y Servicios para la Evaluación del Proceso de Sanitización”, con la finalidad de tener un registro controlado y documentado de dicho proceso.
  
- Ante cualquier incremento significativo en la carga microbiológica que se acerque o sobrepase los límites establecidos en el PNO antes mencionado, será motivo de evaluar nuevamente las soluciones sanitizantes, y revisión al proceso de sanitización, para posibles modificaciones a las soluciones o al mismo proceso.
  
- Desde una perspectiva microbiológica, tal como lo recomienda la USP, respecto al programa para monitorear ambientes y equipos, es necesario extender a todas las áreas del laboratorio el control microbiológico.

## **VIII. ANEXOS**

### **ANEXO 1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**

Al preparar un medio de cultivo deben tomarse en cuenta las siguientes recomendaciones:

Deben emplearse medios de cultivo deshidratados comerciales y durante la preparación respetar estrictamente las indicaciones del fabricante.

Pesar cuidadosamente y con exactitud el medio deshidratado en áreas libres de corrientes de aire y con poca humedad.

Todo tipo de medio es sensible al calentamiento por lo que no debe calentarse más de lo especificado por el fabricante.

Cuando el fabricante lo indique, ajustar el medio a pH óptimo.

No emplear medios de cultivo preparados sólidos ó líquidos que muestren signos de deshidratación o evaporación respectivamente.

Procedimiento.

Seleccionar el medio a preparar y verificar las indicaciones del proveedor.

Preparar la cantidad de medio necesaria de acuerdo a la cantidad de placas que van a ser empleadas tomando en cuenta que se requieren de 15 a 20 mL de medio por placa.

Colocar aproximadamente la mitad del volumen requerido de agua purificada en un matraz de vidrio cuya capacidad sea por lo menos 2 veces el volumen del medio que se va a preparar.

Agregar el medio pesado con agitación hasta obtener una suspensión homogénea, completar el volumen de agua incorporando las partículas del medio que pudieran quedar adheridas a la pared interna del matraz.

Calentar, cuando así lo indiquen las recomendaciones del fabricante, agitando frecuentemente.

Distribuir el medio antes de que se enfríe, en tubos o matraces en cantidades que no superen las 2/3 partes del volumen de los recipientes, y colocar la tapa de baquelita a medio cerrar o cerrar con tapón de gasa y algodón protegiendo éstos con papel Kraft. Al concluir el proceso de esterilización apretar los tapones de baquelita.

Someter a esterilización por calor húmedo de acuerdo al procedimiento GCC-PNO-JLA-15, “METODOS DE ESTERILIZACIÓN”.

Hay medios de cultivo que no requieren esterilización. Verificar en el instructivo del fabricante.

Determinar el pH a una porción de 50 mL del medio estéril a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , si el fabricante no indica otra cosa. Ajustar, si es necesario, con solución 0.5M de ácido clorhídrico ó hidróxido de sodio según sea el caso, en la campana de flujo laminar o en la zona bacteriológica del mechero.

Cualquier ingrediente que se requiera agregar al medio después de la esterilización debe incorporarse en condiciones asépticas a una temperatura no mayor a los  $50^{\circ}\text{C}$ .

Cuando se requiera distribuir el medio de cultivo en placas, vaciar entre 15 y 20 mL del mismo en cajas de Petri estériles y a una temperatura no mayor a los  $50^{\circ}\text{C}$ , evitando tocar con los dedos la boca del recipiente que contiene el medio. Realizar esta operación en la campana de flujo laminar o en la zona bacteriológica del mechero.

Eliminar el exceso de humedad de las placas por cualquiera de los métodos siguientes colocando las placas en forma invertida (Agar hacia arriba):  
estufa a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.  
en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas.  
a temperatura ambiente durante 16 horas.

Almacenar los medios de cultivo en refrigeración ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ). Las placas deben almacenarse envueltas en aluminio o dentro de bolsas de plástico. Todos los medios deben estar perfectamente identificados.

Registrar el medio de cultivo preparado en el Formato GC-PNO-JLA-09/F1, “DESCARGO DE MEDIOS DE CULTIVO” cada vez que se prepare, asignándole el número de preparación correspondiente, el cual consiste en adicionarle al número de lote interno un número consecutivo conforme se prepare, separado por un guión.

El número de preparación asignado a cada medio de cultivo debe quedar registrado en el reporte de cada análisis en el cual fue utilizado.

## ANEXO 2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES SANITIZANTES.

### ALCOHOL ETÍLICO 70 % V/V.

Con la ayuda de una probeta graduada de 1000 mL medir con exactitud 729 mL de Alcohol Etílico al 96% y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

### HIL-PHENE II AL 1 % V/V.

Con la ayuda de una pipeta graduada de 10 mL medir con exactitud 7.8 mL de solución concentrada de Hill-Phene II y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

### ALCOHOL ISOPROPÍLICO AL 70 % V/V.

Con la ayuda de una probeta graduada de 1000 mL medir con exactitud 700 mL de alcohol Isopropílico puro y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

### CLORURO DE BENZALCONIO AL 1 % V/V.

Con la ayuda de una probeta graduada de 100 mL medir con exactitud 100 mL de solución de Cloruro de Benzalconio al 10% y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

### CITRICIDAL AL 1 % V/V.

Con la ayuda de una pipeta graduada de 25 mL medir con exactitud 17 mL de solución concentrada de Citricidal y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar con agua deionizada y mezclar.

### ANEXO 3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

#### **Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (solución concentrada).**

En un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de agua deionizada y disolver 3.4 g de fosfato monobásico de potasio, ajustar el pH a 7.2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, (aproximadamente 1.75 mL), aforar con agua deionizada y mezclar. Envasar en frasco lecheros de boca ancha con tapa de vaquelita. Esterilizar de acuerdo a GCC-PNO-JLA-15 “Esterilización por calor seco y calor húmedo”, enfriar y conservar en refrigeración.

#### **Solución amortiguadora de fosfatos diluida.**

Colocar 1.25 mL de solución amortiguadora de fosfatos (solución concentrada) en un matraz volumétrico de 1000 mL aforar con agua deionizada, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL y 99 mL, en tubos y frascos lecheros que tengan tapa, respectivamente. Esterilizar de acuerdo a GCC-PNO-JLA-15 “Esterilización por calor seco y calor húmedo”.

#### **Solución neutralizante concentrada.**

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL calentar 50 mL de agua deionizada a una temperatura de 55°C a 60°C, añadir poco a poco y con agitación 4 g de Azolecitina (Lecitina de soya), hasta su total incorporación. Posteriormente añadir 28 mL de Polisorbato 80 y 0.125 mL de la solución amortiguadora de fosfatos (solución concentrada), ajustar el pH a 7.2 con solución de hidróxido de sodio 1 N o solución de ácido clorhídrico 1 N, aforar a un volumen de 100 mL. Distribuir la porción en un frasco lechero de boca ancha con tapa de vaquelita; esterilizar de acuerdo a GCC-PNO-JLA-15 “Esterilización por calor seco y calor húmedo”.

#### **Solución neutralizante diluida.**

En un matraz volumétrico de 2000 mL mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos (solución concentrada), aforar con agua deionizada. Distribuir en porciones de 99 mL en frascos lecheros de boca ancha con tapa de vaquelita y de 9 mL en tubos de 20 mm x 150 mm con tapa de rosca. Esterilizar de acuerdo a GCC-PNO-JLA-15 “Esterilización por calor seco y calor húmedo”.

#### **Solución peptonada.**

Colocar 1.0 g de peptona de caseína, 8.5 g de cloruro de sodio, agregar 1.25 mL de solución amortiguadora de fosfatos (solución concentrada) en un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar aproximadamente 500 mL de agua deionizada y mezclar perfectamente hasta la completa disolución, aforar con agua deionizada, distribuir en porciones de 10 mL en tubos de ensaye con tapa de rosca. Esterilizar de acuerdo a GCC-PNO-JLA-15 “Esterilización por calor seco y calor húmedo”

## IX. REFERENCIAS

- Allan L. Truant.(2002). *Manual of comercial methods in clinical microbiology*. USA: ASM Press. 123,432-433.
- Antúnez S. y Carro A.M. (2001).*Validación de métodos analíticos*. Barcelona, España: *Métodos de Microbiología, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria*. 231.
- Bibek Ray. (2001). *Fundamental Food Microbiology (2a ed.)*. Washington: CRC Press.123.
- Blanca L. Cedujo y M. Lourdes Garzón. (2004). *Aspectos esenciales par la validación de procesos en la industria farmacéutica*. México: *SERIES ACADEMICAS, UAM*. 43,48.
- D.A. Mossel. (2002). *Microbiología de los alimentos (2ª ed)*. España: Acribia. 67-69.
- Diane O. Fleming. (2000). *Biological Safety Principies and practices (3ra ed)*. Washington D.C: ASM Press. 56-61.
- Edilberto Pérez Montoya. (2005). *Guía para el control microbiológico de medicamentos (2da ed.)*. México: CIPAM. 23-33.
- Elmer W. Koneman. (2000). *Diagnostico microbiológico, Texto y atlas a color (5ª ed)*. México: Editorial Médica Panamericana 55,67,70.
- Secretaría de Salud. (2004). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos(8ª ed.) (Vol I y II)*. México: Secretaria de Salud. 489.
- Figueroa G.A, (2003) *Diseño y actualización de documentación referente al sistema de aseguramiento de calidad en un laboratorio Farmacéutico con base en las normas GMP OMS*. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.241, 249.
- Flores O. (2004). *Estudio preliminar para la validación de sanitización de áreas en una planta Farmacéutica de Soluciones Parenterales*. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 52-56.
- García Córdoba. (2004), *La tesis y el trabajo de tesis*. México: Limusa, 65,70.
- Geo F. Brooks. (2002). *Microbiologia Médica (17ª ed)*. México: Manual Moderno. 23-26.

Isa J.P, (2001). *Validación de un proceso de manufactura en la Industria Farmacéutica*. Santiago, Chile: Unidad de Practica profesional para optar al titulo de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile. 65-71.

J. A. García Rodríguez. (1999). *Microbiología Médica*. Barcelona, España: Haurcourt. 18.

J. Leveau. (2000). *Microbiología Industrial, Los organismos de interés industrial*. España: Acribia. 45-49.

J. Nicklin. (2002), *Microbiology (2ª ed)*. USA: BIOS. 34,65.

James M.Jay. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos(4ª ed)*. España: Acribia. 24-29.

James Swarbrick. (2001). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Vol XVI)*. USA: Acribia. 54,58.

Jean F. Mac Faddin. (2000). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clinica (3ª ed)*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.342,359.

Jorge Tay Zavala. (2003). *Fundamentos de Microbiología y Parasitología Medica*. México: Méndez Editores.321-326.

Kenneth J. Ryan. (2005). *Microbiología Médica (4ª ed)*. México: Médica Panamericana. 157.159.

Lansing M. Prescott. (2002). *Microbiología (5ª edi)*. Madrid, España: Mc Graw Hill Interamericana.142-148.

López de Mataruna P. (2000). *Validación en los procesos farmacéuticos*. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 253, 267.

Mario Tamayo. (2002). *El proceso de la investigación científica (4ª ed)*. México: Méndez editores.437-444.

Merk. (2000). *Manual de Medios de Cultivo*. México: Merk.88-93.

Michael P. Doyle. (1997). *Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*. España: Acribia.562-567.

Ministerio de Salud. (2001). *Normas Técnicas para el Control de Calidad de Medicamentos y Cosméticos*. España: Ministerio de salud.45-6.

*Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSAI-1993, ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES SANITARIAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.*

*Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM- 089-SSAI, BIENES Y SERVICIOS, METODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO MICROBIANO EN PRODUCTOS DE BELLEZA.*

*Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSAI-1994 BIENES Y SERVICIOS, METODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.*

*Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSAI-1994 BIENES Y SERVICIOS, METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS CULIFORMES TOTALES EN PLACA.*

*Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSAI-1994 BIENES Y SERVICIOS, METODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS.*

*Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSAI-1993, BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO FARMACÉUTICA DEDICADOS A LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS.*

*Nuria García Díaz. (2000). Desarrollo y validación de una metodología para la limpieza de áreas de producción de tabletas de penicilina. España: Acriba. 97-103-*

*Paul Singleton. (2004). Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina. España: Acriba. 198, 201-207.*

*Pei Yang, Kim Burson, et al. (2005). Muestreo con hisopo para la validación de limpieza, Pharmaceutical Technology. ( Vol 3, Numero 1), 25-32.*

*Pharmacopeia USP 29. (2006). Microbiological evaluation of clean room and other controlled environment. USA.4084-4089.*

*Ramón Díaz. (2003). Manual práctico de Microbiología. (2ª ed). España: Masson.251, 256.*

*Sanitas, Instituto. (2000). Resumen Normas GMP. Santiago, Chile: Instituto Sanitas. 4-27.*

*Revista Cubana farmacéutica. (2005) (online), Vol 34, No 12, Enero-Abril.*

*Sebastián Andrés Rodríguez Pineda. (2005). Validación microbiológica del proceso de sanitización en el área de líquidos. Santiago, Chile: Instituto Sanitas. 27-49.*

*Zorrilla A. Santiago. (2002). Guía para la elaboración de tesis (2ª ed). México: Mc Graw Hill 43-49..*

*<http://www.ecolab.com>, junio, 2004.*

*<http://www.fda.gov/cder/guidance/4286fnl.htm>/jul03.*