



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS  
DE OPERACION BASICA DE CONTROL DE CALIDAD  
MICROBIOLOGICA EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**PRESENTA:**

**XOCHITL MOZO ACEVEDO**

**ASESORA: M. EN C. CAROLINA MORENO RAMOS**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.  
2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*DEDICATORIAS*

*ESTE TRABAJO LO DEDICO  
CON AMOR Y AGRADECIMIENTO A MIS PADRES*

*LUCY Y DOMIS*

*A QUIENES SIN ESCATIMAR ESFUERZO ALGUNO HAN  
SACRIFICADO GRAN PARTE DE SU VIDA PARA FORMARME Y EDUCARME,  
POR SUS CONSEJOS PARA MEJORAR DIA A DIA, POR SU APOYO, MOTIVACION  
Y COMPRESION QUE ME AYUDAN SIEMPRE A SEGUIR ADELANTE.*

*A QUIENES LA ILUSION DE SU VIDA HA SIDO CONVERTIRNOS  
EN PERSONAS DE PROVECHO, A QUIENES NUNCA PODRE PAGAR TODO,  
NI AÚN CON LAS RIQUEZAS MAS GRANDES DEL MUNDO,  
POR ESO Y MAS ESTE TRIUNFO ES NUESTRO,  
POR QUE LOS AMO Y AMARE SIEMPRE  
CON TODO EL CORAZON  
MIL GRACIAS*

*A MIS HERMANOS*

*ROBERT, VICKY Y AURIS*

*POR SU APOYO, COMPRESION Y ESTIMULO  
EN LA REALIZACION DE MIS METAS,  
POR QUE LOS QUIERO MUCHO  
Y POR QUE ME HAN DADO UNOS SOBRINOS MARAVILLOSOS*

*A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS  
DE LA FES-CUAUTITLAN  
POR LO MOMENTOS VIVIDOS  
LOS CUALES QUEDARAN GRABADOS POR SIEMPRE*

*A MI ASERORA DE TESIS CARO  
POR EL APOYO QUE ME BRINDO  
PARA CULMINAR ESTE PROYECTO*

## INDICE

		PAGINAS
<b>I.</b>	Símbolos y abreviaturas	1
<b>II.</b>	Glosario	3
<b>III.</b>	Objetivos	6
<b>IV.</b>	Justificación	7
<b>V.</b>	Marco teorico	8
	1 Introducción	8
	2 Gestión de calidad	8
	3 Función de la calidad en la indistria farmacéutica	9
	4 El departamento de control microbiológico	10
	5 La importancia de la microbiología en la industria farmacéutica	12
	a) Breve historia de la microbiología	12
	b) Los microorganismos	12
	c) Las bacterias	12
	d) Los hongos	13
	e) Virus y protozoarios	14
	f) La microbiología en la industria	14
<b>VI.</b>	Normas nacionales e internacionales	15
	a) NOM 059-SSA-1993	15
	b) Buenas prácticas de documentación (BPD)	16
	c) Buenas prácticas de manufactura (BPM)	17
	d) Especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)	17
	e) Norma ISO 9000	18
<b>VII.</b>	Procedimientos Normalizados de Operación (PNO's)	19
<b>VIII.</b>	Formatos de PNO's	20
<b>IX.</b>	Componentes de los formatos de PNO's	23
<b>X.</b>	¿Cómo realizar PNO's?	24
	1 Procedimiento para elaborar y/o actualizar PNO's	25
	2 Procedimiento para realizar cambios a procedimientos (Documento de cambios DC)	29
<b>XI.</b>	Formatos de capacitación de PNO's	33
<b>XII.</b>	Areas del departamento de control de calidad microbiológico en la industria farmacéutica	34
<b>XII.</b>	PNO's del laboratorio de control de calidad microbiológico en la industria farmacéutica	36
	3 Procedimiento para el vestido y desvestido del área estéril	37
	4 Procedimiento para la operación del autoclave	40
	5 Procedimiento para limpieza de hornos e incubadoras	43
	6 Procedimiento para la preparacion de reactivos, soluciones y medios de cultivo	45
	7 Procedimiento para sembrar por el metodo de dilución y el método de aislamiento por estría	49
	8 Procedimiento para la técnica de vaciado en caja	52
	9 Procedimiento para el control de calidad de los medios preparados	54
	10 Procedimiento para la promoción de crecimiento	57
	11 Procedimiento para la identificación de microorganismos	61
	12 Procedimiento para la tinción de Gram	67
	13 Procedimiento para la tinción de esporas	70
	14 Procedimiento para el límite microbiano de materia prima	73
	15 Procedimiento de control ambiental	78
	16 Procedimiento para la toma de muestra del personal	81
	17 Procedimiento para la toma de muestra de aire filtrado	84
	18 Procedimiento para el muestreo y análisis microbiológico de aguas	86
<b>XIV.</b>	Conclusiones	92
<b>XV.</b>	Anexos	94
	Anexo I Reactivos soluciones y medios de cultivo	94
	Anexo II Buenas prácticas de manufactura	111
	Anexo III Pruebas bioquimicas API	116
<b>XVI.</b>	Bibliografía	120

## I. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Para poder comprender algunas de las abreviaturas que son empleadas con mayor frecuencia en la industria farmacéutica y específicamente en el laboratorio de Control de Calidad Microbiológico utilizaremos gran cantidad de símbolos y abreviaturas por lo tanto se deberá entender lo siguiente:

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
AEM o AME	Agar Extracto de Malta
ALM	Agar Letthen modificado
AMC	Agar MacConkey
API	Ensayos bioquímicos estandarizados
AVJ	Agar Vogel Johnson
BPM o GMP's	Buenas Prácticas de Manufactura (Good Manufacturing Practices)
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
CDS	Caldo Dextrosa Sabouraud
CFR	Código Federal de Regulaciones (Codig Federal of Regulations)
CLM	Caldo Letthen Modificado
°C	Grados Celsius
c.b.p.	Cuanto Basta Para
COFEPRIS	Comision Federal para la Proteccion Contra Riesgos Sanitarios
CST	Carbohidratos solubles totales
DGIS	Direccion General de Insumos Para La Salud
DNA	Acido Desoxirribonucleico
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
FDA	Federal Drugs Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
Ft <sup>3</sup>	Pie Cúbico
g	Gramos
HCl	Acido Clorhídrico
H <sub>2</sub> S	Acido Sulfhídrico
ISO	International Organization for Standardization
Kg	Kilogramo
LIA	Agar Hierro y Lisina
LNSP	Laboratorio Nacional de Salud Pública
LGS	Ley General de Salud

LAL	Lymulus Amebocyte Lysate
m	Metro
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
min	Minutos
MIO	Medio Indol Ornitina
mL	Mililitros
MR-VP	Medio rojo de metilo Voges Proskauer
NaOH	Hidróxido de Sodio
No.	Número
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de Salud
PDA	Agar Papa Dextrosa
pH	Logaritmo Negativo de la Actividad del Ion Hidrógeno
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
p/v	Peso Sobre Volumen
Q.P	Químicamente puro
RCS	Reuter Centrifugal Sampler
Rodac	Replicate Organism Detection and Counting
SDA	Agar Destroxa Sabouraud
s	Segundo
SI	Sistema Internacional
SEMARNAP	Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
SSA	Secretaria de Salud
TSI	Agar Hierro y Triple Azúcar
TSA	Agar Soya Trypticaseina
UE	Unidad de Endotoxina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
US	Sistema Estadounidense
USP	United States Pharmacopeial
μ	Micras
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen sobre Volumen

## II. GLOSARIO

**Aeróbico:** Microorganismo capaz de crecer en presencia de oxígeno libre.

**Agua residual de la industria farmacéutica** : Agua descargada resultante de las actividades relacionadas con la fabricación de los medicamentos.

**Area:** Cuarto o conjunto de cuartos y espacios diseñados y construidos bajo especificaciones definidas.

**Área aséptica:** Zona comprendida dentro del area limpia diseñada y construida para minimizar la contaminación por partículas viables y no viables, manteniendola dentro de los límites preestablecidos.

**Área crítica aseptica:** Zona dentro del área aséptica en el cual los productos, los recipientes, etc, están expuestos al medio ambiente.

**Área limpia:** Area diseñada y construida y mantenida con el objeto de tener dentro de límites el número de partículas viables y no viables en superficies y medio ambiente

**Anaeróbico:** Microorganismo capaz de crecer en ausencia de oxígeno libre..

**Aseguramiento de la calidad:** Conjunto de actividades planeadas y sistematicas que lleva a cabo una empresa con el objeto de brindar la confianza de que el producto o servicio cumple con los requisitos de calidad especificados.

**Aséptico:** Libre de microorganismos que son capaces de causar contaminación o enfermedad

**Bacterias:** Microorganismos unicelulares que derivan del reino vegetal, incluidos en el grupo de los Schycomysetes, su tamaño es variable y oscila entre 0.5-2  $\mu$ , algunos tienden a formar filamentos y pueden llegar a medir 30-40  $\mu$ . Por su forma se encuentran esféricas (cocos), bastones (bacilos) y espirales (vibrio), se reproducen por bipartición.

**Biocarga:** Concentración de UFC presentes en un elemento determinado.

**Bioterio:** Area especializada en el mantenimiento, control y/o producción de diversas especies de animales destinadas para la realización de pruebas del laboratorio.

**Buenas practicas de fabricación:** Conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí destinadas a garantizar que los productos farmacéuticos elaborados tengan y mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad, requeridas para su uso.

**Calidad:** Cumplimiento de especificaciones establecidas para garantizar la aptitud de uso.

**Concentración:** Cantidad de fármaco presente en el medicamento expresada como peso/peso, peso/volumen o unidad de dosis/volumen.

**Contaminación:** Presencia de entidades químicas, físicas y biológicas indeseables.

**Contenido microbiano:** El número de microorganismos mesofílicos aerobios viables, hongos, levaduras y microorganismos objetables (patógenos) presentes en productos de belleza, que determina si el producto es apto para el uso humano.

**Especificaciones:** Descripción de un material, sustancia o producto, que incluye los parámetros de calidad, sus límites de aceptación y la referencia de los métodos a utilizar para su determinación.

**Estéril:** Medio totalmente libre de microorganismos viables.

**Etiqueta:** Cualquier marbete, rotulo, marca o imagen grafica, escrita impresa, etc, en cualquier material susceptible a contener el medicamento incluyendo el envase mismo, en caracteres legibles e indelebles.

**Fabricación:** Operaciones involucradas en la producción de un medicamento desde la recepción de materiales hasta su liberación como producto terminado.

**Fármaco:** Sustancia natural o sintetica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presenten en forma farmacéutica y que reúnan condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.

**Inactivación:** Acción de transformar la actividad química o biológica de los residuos medicamentosos inutilizados para su uso farmacéutico.

**Lote:** Cantidad de un fármaco o medicamento que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es su homogeneidad.

**Materia prima :** Sustancia de cualquier origen que se usa para la elaboración de medicamentos o fármacos.

**Medicamento:** Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.

**Medio:** Cualquier material líquido, sólido o semisólido, que soporta el crecimiento de microorganismos. Se le denomina medio de cultivo a las diferentes mezclas de sustancias nutritivas empleadas en el laboratorio para el cultivo de microorganismos.

**Medios diferenciales:** Son los que permiten distinguir entre las colonias de un organismo determinado y las de otro.

**Medios enriquecidos :** Son los que favorecen en general el desarrollo de los microorganismos.

**Medios múltiples:** Son medios que tienen incluidas sustancias que nos permiten determinar una prueba bioquímica. Usualmente dichos medios contienen dos o más pruebas al mismo tiempo.

**Medios selectivos:** Son medios sólidos que permiten el crecimiento de una clase de organismos, mientras que inhibe el de otros.

**Organismos coliformes:** Son bacilos gram negativos, aerobios, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas cuando se incuban a 32-35°C. Una variedad de bacterias, muy abundantes y siempre presentes en la materia fecal del hombre y animales superiores; también pertenecen a ese grupo ciertas bacterias propias del suelo y vegetales.

**Patógeno:** Un organismo que es capaz de causar enfermedad a un animal o planta.

**Partículas viables:** Cualquier partícula que bajo condiciones ambientales apropiadas puede reproducirse.

**Procedimiento normalizado de operación :** Documento que contiene las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación.

**Producto:** Es el resultado de un proceso específico.

**Pureza:** Grado en el cual las materias primas, los productos intermedios y a granel, están exentos de materiales extraños.

**Sistemas críticos:** Son aquellos que tienen impacto directo de los procesos y/o productos.

**Validación:** es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y atributos de calidad establecidos.

## **OBJETIVOS**

### III. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL:

- ✘ Elaborar un manual de Procedimientos Normalizados de Operación (PNO's) básica en el área de control de Calidad Microbiológico, que cumplan con los requisitos que marcan las normas oficiales mexicanas (NOM's), internacionales y especificaciones farmacopeicas: como son la NOM-059-SSA, Federal Drugs administración (FDA por sus siglas en ingles), el Código Federal de Regulaciones (CFR) entre otras.

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✘ Investigar y revisar las normas oficiales mexicanas e internacionales y especificaciones farmacopeicas como son: la NOM-059-SSA, Federal Drugs administración, el Código Federal de Regulaciones entre otras, para el buen funcionamiento del Control de Calidad Microbiológico en la industria Farmacéutica.
- ✘ Implementar un procedimiento general que contenga las instrucciones necesarias para la elaboración de Procedimientos Normalizados de Operación.
- ✘ Realizar una revisión bibliográfica sobre el área de Control de Calidad Microbiológica en la industria Farmacéutica.
- ✘ Llevar a cabo una redacción de la información actualizada sobre Procedimientos Normalizado de Operación de Microbiología en la industria Farmacéutica.
- ✘ Integrar y redactar la información recopilada y aplicar las normas oficiales mexicanas e internacionales que se requieren en la industria Farmacéutica, para la elaboración del manual de Procedimientos Normalizados de Operación básica en el área de control de Calidad Microbiológica

# **JUSTIFICACION**

#### IV. JUSTIFICACION

El propósito de esta tesis esta enfocado inicialmente a la investigación y revisión bibliográfica sobre algunas normas oficiales nacionales e internacionales como son la NOM-059-SSA “Buenas practicas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”, el Código Federal de Regulaciones, la ley general de salud, el reglamento de insumos para la salud, Buenas Practicas de Manufactura, etc. Que serán aplicados en la industria farmacéutica muy específicamente en el laboratorio de control de calidad microbiológico.

Dado el tipo de bienes que produce y que inciden en la salud de la población la industria farmacéutica, debe cumplir con una serie de requisitos normativos, los cuales nos guíen en el desarrollo de métodos adecuados y funcionales destinados a efectuar los procesos de manufactura de medicamentos y su control de calidad, por lo tanto no debemos perder de vista el cumplir con los requerimientos mínimos exigidos para la fabricación de productos farmacéuticos.

El siguiente paso es elaborar un Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) general que nos indique paso a paso la forma de realizar procedimientos, que nos mencione con base al reglamento de insumos para la salud y los lineamientos para la elaboración, contenido, formato y que describa de forma detallada, explícita y por escrito las operaciones, precauciones, etc. que deben ser aplicadas directamente o indirectamente en alguna actividad o proceso. Se muestran algunos formatos que pueden ser utilizados para la elaboración de los PNO's y se mencionan los contenidos de estos formatos; cuales son de carácter obligatorio y cuales pueden ser opcionales.

Se describirán algunos PNO's que aplican al laboratorio de control de calidad microbiológico, es de nuestro conocimiento que existe una gran variedad de actividades que realiza el Químico Farmacéutico Biólogo, Químico Biólogo Parasitólogo, etc. en el área de laboratorio de microbiología sin embargo, enfocaré este trabajo a los procedimientos mas usuales; las responsabilidades, los materiales equipos, reactivos, personas, instalaciones etc. Y mencionaré de forma general otros procedimientos no menos importantes en el laboratorio de control de calidad microbiológico.

Cabe mencionar el utilizar cuadernos de registro después de realizada toda operación, ya que la NOM-59 nos solicita la rastreabilidad de datos, es decir la capacidad de reconstruir la historia y localización de alguna actividad por medio de documentos o registros.

Es importante mencionar la finalidad de realizar PNO's para el laboratorio de control de calidad microbiológico es:

- Definir las áreas, el material y procesos en el laboratorio
- Garantizar que el personal involucrado en las actividades conozca como, cuando y donde realizar la actividades.
- Asegurar que existan las evidencias de la actividad realizada.
- Minimizar los riesgos potenciales de error.
- Facilitar el entrenamiento a las personas que ingresan y forman parte de éste equipo de trabajo.

**MARCO TEORICO**

## **V. MARCO TEORICO**

### **1.0 INTRODUCCION**

Dado el tipo de bienes que produce y que inciden en la salud de la población, la industria farmacéutica debe de cumplir con una serie de requisitos normativos, los cuales nos guían en el desarrollo de métodos adecuados y funcionales destinados a efectuar los procesos de manufactura de medicamentos y su control. Por lo tanto no se deberá perder de vista el deber de cumplir con los requerimientos mínimos exigidos para la fabricación de productos farmacéuticos.

El proceso de producción de un medicamento en la industria farmacéutica puede agruparse en dos etapas fundamentales como se describen a continuación:

- A. La fabricación: que son las operaciones involucradas en la producción de un medicamento desde la recepción de los materiales hasta su liberación como producto terminado, es aquí donde se llevan a cabo todas las operaciones necesarias para su elaboración y envasado.<sup>1</sup>
- B. El acondicionamiento del producto, que son las operaciones por las que el producto en su envase primario tiene que pasar para transformarse en producto terminado; en donde se llega a la presentación final para su conservación, almacenamiento y distribución.<sup>1</sup>

En cada uno de los procesos mencionados se lleva a cabo un control de calidad y para garantizar un producto farmacéutico de calidad se deben de cumplir con pruebas de laboratorio como son: análisis químicos, análisis fisicoquímicos, análisis microbiológicos y estudios de estabilidad del producto.

### **2.0. GESTION DE CALIDAD**

El sistema de gestión de la calidad es el conjunto de elementos interrelacionados de una empresa u organización por los cuales se administra de forma planificada la calidad de la misma, en la búsqueda de la satisfacción de sus clientes.

Los principales elementos son:

- ✓ La estructura de la organización: responde al organigrama de la empresa donde se jerarquizan los niveles directivos y de gestión.
- ✓ La estructura de responsabilidades: implica a personas y departamentos.
- ✓ Los procedimientos: responden al plan permanente de pautas detalladas para controlar las acciones de la organización.
- ✓ Los procesos: responden a la sucesión completa de actividades dirigidos a la consecución de un objetivo específico.
- ✓ Los recursos: no solamente económicos, sino humanos y técnicos, deberán estar definidos de forma estable y además de estarlo de forma circunstancial.

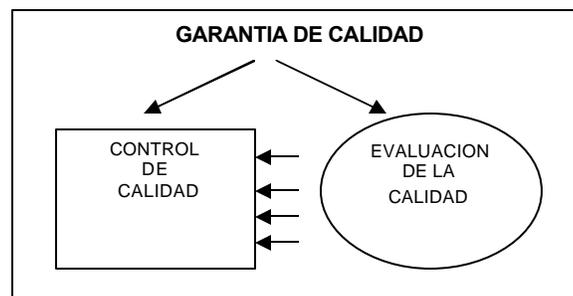
Estos cinco apartados deben estar definidos y claros en una empresa.

El sistema de gestión de la calidad en una organización tiene como punto de apoyo el manual de calidad, y se completa con una serie de documentos adicionales como manuales, procedimientos, instrucciones técnicas, registros y sistemas de información, en este esquema existe un responsable de calidad que velará por el cumplimiento de lo mencionado. Normalmente sigue una norma de calidad una de las normas más conocidas y utilizadas a nivel internacional para gestionar la calidad, es la norma ISO 9001:2000 o la norma ISO 14001 que aplica para la gestión ambiental y es compatible con la gestión de calidad.

### 3.0 FUNCION DE LA CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

La calidad en la industria farmacéutica es de suma importancia entendiéndose por calidad al cumplimiento de especificaciones establecidas, es decir; que la calidad de un medicamento esta determinada por su identidad, pureza, contenido y potencia o cualesquiera otras propiedades químicas, físicas, biológicas o del proceso de fabricación que influyen en sus características para producir el efecto para el cual se destina.<sup>1</sup>

La Calidad tanto en su enfoque específico, referido a productos y sistemas o procesos y servicios tiene tres elementos conectados entre si.<sup>2</sup>



**Figura 1.** Elementos básicos de la calidad.

Microbiological Methods Seventh Edition Collins and Lyne's. Editorial Acribia. 1999.

La Garantía de Calidad de un laboratorio analítico se refiere al conjunto de actividades planificadas, realizadas y contrastadas para asegurar que la información analítica que genera sea confiable y que tenga el nivel de calidad que se ha establecido previamente.

Por otro lado los Sistemas de Garantía de Calidad emplean los Sistemas de Evaluación de la Calidad para contrastar con la periodicidad adecuada, la eficacia y adecuación de los sistemas de Control de Calidad. Como se observa en la figura 1.

Control de Calidad se define como el conjunto específico de actividades planificadas y efectuadas para proporcionar un producto, sistema o servicio con un nivel definido de calidad que sea satisfactorio, adecuado fidedigno y rentable en la empresa.

La evaluación del Control de la calidad se define como el conjunto específico de actividades planificadas y ejecutadas con el objetivo de asegurar que las actividades implicadas en el Control de calidad se realicen de forma adecuada y eficaz.

De esta forma hablamos también del Plan de Garantía de Calidad que constituye el núcleo básico de la calidad de los laboratorios analíticos definido como el conjunto pormenorizado de actividades conducentes a asegurar la calidad de los resultados, dando lugar al denominado Manual de Calidad, que debe convertirse en el pilar básico del trabajo en el laboratorio, ya que los manuales documentan la experiencia de la organización, incluyendo claramente lo que ha probado ser útil, considerando lo que los procesos deben o no hacer para que estos cumplan con su razón de ser de una manera más eficiente.

Así las buenas prácticas de laboratorio (GLPs: Good laboratory Practices) o Buenas prácticas de Manufactura GMP's (Good manufacturing practices) son un conjunto de reglas, procedimientos operativos y prácticas de obligado cumplimiento, establecida por una determinada organización para asegurar la calidad de la información generada por el laboratorio analítico.

Los Procedimientos Normalizados de Operación PNO's abarcan la descripción de todas las operaciones del laboratorio desde la entrada de la muestra hasta la adquisición y archivo de datos así como los procesos administrativos involucrados y deben garantizar que todas las operaciones puedan ser reproducidas por otro personal.<sup>3</sup>

#### **4.0 EL DEPARTAMENTO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO**

Hablando del Departamento de Control Microbiológico, éste se dedica principalmente a la realización de pruebas que permitan demostrar que en un producto farmacéutico, las materias primas con las que es fabricado, las condiciones de las áreas de muestreo de materias primas, fabricación, acondicionamiento, análisis, personal y equipos donde se realizó su producción están libres de contaminación por microorganismos.

Algunos de los productos de la industria farmacéutica deben ser estériles, es decir deben estar libres de microorganismos, por lo cual los análisis microbiológicos estériles y no estériles son esenciales por varias razones:

- a) La seguridad del paciente
- b) La calidad del producto
- c) Los requerimientos legales
- d) Los requerimientos regulatorios, etc.<sup>4</sup>

Como se mencionó con anterioridad la calidad de los productos farmacéuticos se asegura con las GLP's, donde el objetivo principal es tener resultados exactos y precisos en los análisis, que éstos sean confiables y que nos den la seguridad de que el producto es liberado para su comercialización cumpliendo con las especificaciones de calidad con las que fue diseñado.

Los procesos de manufactura controlados son vitales para la seguridad y calidad en los productos farmacéuticos, es por ello que el monitoreo microbiológico de los procesos

es una vía esencial para demostrar que se cumple con las GMP's. En consecuencia el control de calidad microbiológico es una fase importante en el proceso de producción.

Para realizar pruebas de control microbiológico se utilizan medios de cultivo que sirven para la selección, diferenciación, recuento y la identificación bioquímica y para la prueba de sensibilidad de los microorganismos<sup>6</sup>

Para cada forma farmacéutica o presentación, existe un "límite microbiano" el cual representa el máximo número de microorganismos que se pueden encontrar, por ejemplo: un ungüento tiene mayor número de microorganismos que un inyectable que debe ser estéril, es decir cero microorganismos.

De igual manera existen "microorganismos objetables", es decir son aquellos patógenos (***Pseudomonas aeruginosa***, ***Salmonellas***, ***Escherichia coli***.) que podrían presentarse en un producto o materia prima y que debemos detectar mediante la utilización de medios selectivos o enriquecidos para poder dar un dictamen final de la prueba de ausencia o presencia los cuales varían de una forma farmacéutica a otra; ya que estos medicamentos en lugar de mejorar la salud pueden dañar.

Por ejemplo: un producto farmacéutico destinado para uso vaginal debe estar libre de los siguientes microorganismos: ***Streptococos***, ***Estafilococos***, ***Pseudomonas*** y ***Enterobacterias*** o, un producto administrado por vía oral debe estar libre de ***Escherichia coli*** y ***Salmonella*** principalmente.<sup>7</sup>

A grandes rasgos, estas son algunas de las actividades que se realizan en un Departamento de Control Microbiológico.

## 5.0 LA IMPORTANCIA DE LA MICROBIOLOGIA EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

### a.- Breve historia de la microbiología

Aunque los microorganismos se originaron hace aproximadamente 4.000 millones de años, la microbiología es relativamente una ciencia joven. Los primeros microorganismos se observaron hace 300 años y sin embargo pasaron unos 200 años hasta que se reconoció su importancia.

La microbiología surgió como ciencia gracias al perfeccionamiento del microscopio y a su vez de los microorganismos. Robert Koch, un médico rural alemán empezó a estudiar el mundo microbiano quien anunció al mundo que había encontrado la bacteria del carbunco (***Bacillus anthracis***). Posteriormente él y sus colaboradores descubrieron las bacterias que causan la tuberculosis y el cólera. Esta serie de experimentos se ajustaban a los criterios necesarios para poder establecer la relación causal entre un organismo específico y una enfermedad específica.

Es por ello la importancia de la Microbiología (***mikros*** pequeño, ***bios*** vida y ***logos*** estudio) la cual, es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños también conocidos como microbios.

### b.-Los microorganismos

Son considerados microbios todos los seres vivos microscópicos consistentes en una sola célula, es decir unicelulares, así como aquellos que forman agregados celulares en los cuales todas las células son equivalentes (en los cuales no existe diferenciación celular).

Los microorganismos pueden ser eucariota (las células poseen núcleo), tales como los hongos y los protistas, o procariotas (células carentes de núcleo), como las bacterias y los virus.

Siendo la Microbiología el estudio de los organismos vivos de tamaño microscópico (microorganismos) que incluyen a las bacterias, hongos, protozoos y virus. Nos enfocaremos a las bacterias que son microorganismos unicelulares que derivan del reino vegetal, incluidos en el grupo de los ***Schycomysetes***, su tamaño es variable y oscila entre 0,5-2  $\mu$ , algunos tienden a formar filamentos y pueden llegar a medir 30-40  $\mu$ .

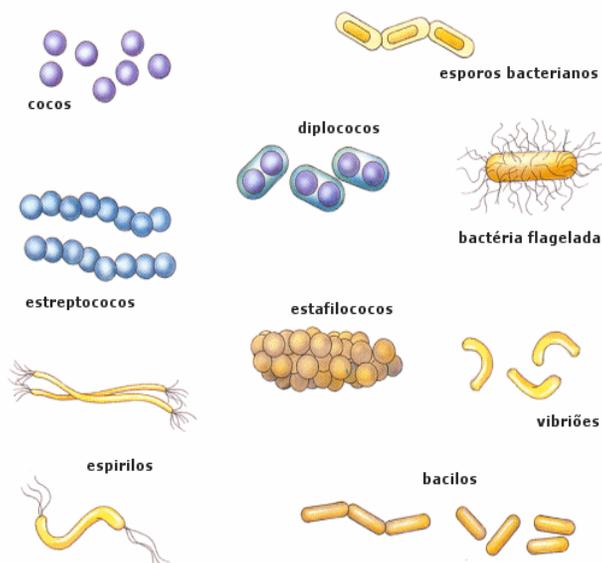
### c.- Las bacterias

Las bacterias pueden presentar una forma esférica (coco) cilíndrica (bacilo), helicoidal (espiroquetas o irregular (micoplasma)).<sup>8</sup>

Los cocos pueden aparecer aislados o agrupados en parejas (diplococos), cadenas (estreptococos), racimos (estafilococos), tétradas o sarcinas (agrupación de 4 y de 8 elementos respectivamente), a su vez los cocos aislados se manifiestan en formas muy diversas, redondeadas, lanceoladas, ovoides, achatados, etc.

Los bacilos varían en longitud desde las formas más pequeñas o cocobacilos a las más largas y filamentosas, pueden aparecer como palillos rectos, curvos en un plano del espacio o ramificados, con extremos redondos, cuadrados o afilados, Los bacilos curvos se denominan vibrios o espirilos.

Las bacterias helicoidales o espirales son las espiroquetas que tienen espiras flexibles y ondulantes<sup>9</sup>, como se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Clasificación Morfológica de las bacterias.

[http://www.cientific.com/tema\\_monera\\_img5.html](http://www.cientific.com/tema_monera_img5.html)

#### d.- Los hongos

Los hongos, son organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción, pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana, macro o microscópicas y su coeficiente de sedimentación del RNAm es de 25 s.<sup>10</sup>

Las formas miceliales se denominan Mohos, algunos tipos como las levaduras no forman un micelio, por otra parte las levaduras, grupo de hongos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular.

Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual. La forma común de reproducción es asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenida en un saco o asca.

Los Hongos se subdividen en Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina.<sup>11</sup>

Los microorganismos, algunos útiles y otros dañinos, están íntimamente asociados a nuestras vidas, muchos son habitantes del cuerpo humano y de los animales, algunos causan enfermedades y otros están implicados en actividades cotidianas<sup>12</sup>

#### e.- Virus y Protozoarios

Los virus son estructuras extraordinariamente pequeñas; son organismos que pueden causar infecciones y que solo se reproducen en células huésped. Los virus fuera de células huésped están en forma inactiva. Los virus se caracterizan por presentar una capa protectora. Su forma puede ser espiral, esférica o como células pequeñas, de tamaño entre 0.02 y 0.009  $\mu\text{m}$ .

Al contrario que las bacterias, los virus no están presentes en el ser humano de manera natural. Cuando las personas quedan afectadas por un virus, estos generalmente se eliminan del cuerpo humano mediante secreciones.

Los protozoarios parásitos son organismos unicelulares, estos se caracterizan por presentar un metabolismo complejo. Se alimentan a base de nutrientes sólidos, algas y bacterias presentes en organismos multicelulares, como los humanos y animales. Se encuentran frecuentemente en forma de quistes o huevos. Por ejemplo, los huevos de ***Cryptosporidium*** y quistes de ***Giardia*** son comunes en aguas afectadas por contaminación fecal. En forma de quistes los patógenos son resistentes a la desinfección por cloro.

De acuerdo a las características de Virus y de protozoarios es muy difícil que estos microorganismos se encuentren presentes en la industria farmacéutica.

#### f.- La microbiología en la industria

En Microbiología se estudian muchos aspectos de microorganismos; donde se encuentran sus características, sus relaciones mutuas, así como con otros grupos de microorganismos, su control y su importancia para nuestra salud y bienestar.<sup>13</sup>

Existen microorganismos patógenos y otros útiles para el hombre, un microorganismo de uso industrial debe producir alguna sustancia de interés, debe estar disponible en cultivo puro, ser genéticamente estable y crecer en cultivos a gran escala. Otra característica importante es que el microorganismo industrial crezca rápidamente y produzca el producto deseado en un corto período de tiempo. El microorganismo debe también crecer en un medio de cultivo relativamente barato y disponible en grandes cantidades. Además, un microorganismo industrial no debe ser patógeno para el hombre o para los animales o plantas. Otro requisito importante es la facilidad de separar las células microbianas del medio de cultivo; la centrifugación es dificultosa o cara a gran escala. Los microorganismos industriales más favorables para esto son aquellos de mayor tamaño celular; hongos, levaduras y bacterias filamentosas ya que estas células sedimentan más fácilmente que las bacterias unicelulares.

Aunque los conocimientos microbiológicos de que se dispone en la actualidad son muy amplios, todavía es mucho lo que queda por conocer y constantemente se efectúan nuevos descubrimientos en este campo. Tanto es así que, según las estimaciones más habituales, sólo un 1% de los microbios existentes en la biosfera han sido estudiados hasta el momento. Por lo tanto, a pesar de que han pasado más de 300 años desde el descubrimiento de los microorganismos, la ciencia de la microbiología se halla todavía en su infancia en comparación con otras disciplinas biológicas<sup>31</sup>

**NORMAS NACIONALES  
E  
INTERNACIONALES**

## VI. NORMAS NACIONALES E INTERNACIONALES

### REVISION DE NORMAS

A continuación realizaremos una revisión de las normas más importantes en la industria farmacéutica:

#### **a) Norma Oficial Mexicana NOM -059-SSA-1-1993. Buenas practicas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.**

Con base a esta norma tenemos los siguientes puntos que destacaremos como importantes dentro de nuestra recopilación de información:

- Que los productos se fabriquen dentro de especificaciones, de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación, procedimientos normalizados de operación (PNO's) y documentos autorizados.
- Que todos los análisis se realicen de acuerdo a las buenas prácticas del laboratorio.
- Debe existir un programa de entrenamiento y entrenamiento del personal en las funciones que le sean asignadas y referente a los PNO's establecido.
- Todos los documentos deben ser escritos en español, impresos en un medio que asegure su legibilidad, empleando vocabulario sencillo, indicando tipo, naturaleza, propósito o uso del documento. La organización de su contenido será la que permita su fácil comprensión.
- Los documentos deben ser emitidos a través de un sistema que asegure que el documento es copia fiel del original.
- La documentación se debe archivar en forma tal que sea de fácil acceso.
- Todos los documentos maestros deben incluir:
  - Título
  - Tipo de documento
  - Paginación
  - Fecha de emisión
  - Nombre
  - Firma y posición de las personas que elaboran, revisaron y autorizaron el documento.
- Debe existir un control que permita la revisión, distribución y modificación o cancelación de los documentos.
- Todos los documentos maestros y operativos originales y la modificación a los mismos deben ser autorizados por el responsable sanitario
- Se debe conservar registros de los cambios realizados a los documentos.

## **b) Buenas prácticas de documentación (BPD)**

- Se deberá considerar el cumplimiento de las Buenas prácticas de documentación; la cuales son un grupo de lineamientos que nos indican las bases mínimas para el desarrollo de un sistema documental que describen los siguientes aspectos.
- Registrar la información inmediatamente después de realizada la actividad (cuadernos de registro)
- Todo cuaderno de registro deberá contener un espacio para observaciones, éstas deberán ser completas, claras y concisas.
- Se deberá emplear únicamente bolígrafos indelebles y con tinta de color autorizado por la empresa.
- No se deberá usar lápiz, goma y correctores.
- Se prohíbe escribir información relacionada con la calidad, en papeles sueltos, en post-it inclusive en la mano.
- En caso de documentos manchados, rotos o con muchos errores, no se deberá transcribir la información de un documento a otro, a menos que lo verifique y autorice el responsable autorizado, el documento o página deteriorada se cancelara, justificara, firmara, fechara y deberá anexarse al documento al cual se transcribió la información y formara parte del nuevo documento.
- Todo error generado deberá estar debidamente firmando fechado y justificado por el personal responsable de dicha acción.
- Se deberá registrar toda actividad inmediatamente después de realizada la actividad.
- Se deberá revisar la actividad realizada inmediatamente después de registrada la información
- No se deberá dejar espacios en blanco, estos deberán cancelarse con una diagonal, firmar fechar e indicar el nombre de la persona que realiza la actividad
- Cuando se requiera corregir un dato, este deberá ser cancelado con una diagonal, indicar la causa de error firmar, fechar y se deberá indicar el dato correcto.

### **c) Buenas prácticas de Manufactura (BPM)**

- Personal calificado, es decir debe tener educación, entrenamiento y experiencia para realizar sus funciones. Además debe existir el personal adecuado en número según las actividades a realizar.
- El diseño y características de construcción, deben ser del tamaño adecuado y específico, suficiente para evitar contaminación y mezclas durante las operaciones diarias.
- Todos los requerimientos de GMP's deben seguirse y documentarse al momento que se lleven a cabo, registrando y justificando cualquier desviación.
- Se debe contar con los controles de laboratorio científicamente establecidos, además de especificaciones, estándares, paneles de muestreo, procedimientos de prueba. Todo debe estar diseñado para asegurar la identidad, pureza, potencia y calidad.
- Los registros de laboratorio deben incluir los datos completos derivados de todas las pruebas necesarias para asegurar la complacencia con especificaciones establecidas y estándares.
- Debe contener una descripción de la muestra recibida para prueba con identificación de fuente de donde se tomo, cantidad, número de lote u otro código distintivo, datos de cuando fue tomada la muestra y de cuando fue recibida en el laboratorio para sus pruebas.
- Debe existir un registro de todos los datos obtenidos en el curso de las pruebas, incluyendo gráficas, cartas y espectro de los instrumentos de laboratorio, apropiadamente identificados para demostrar lo específico del componente, contenedor del producto, cierres, material en proceso, medicamento y lote examinado.
- Deben mantenerse los registros de calibración así como su periodicidad de instrumentos de laboratorio y aparatos.

### **d) Especificaciones de la farmacopea de los estados unidos mexicanos (FEUM)**

Para cumplir con la Buenas Prácticas de Manufactura un laboratorio en la industria farmacéutica se debe contar con el área de documentación en la cual se desarrollen las tareas de elaboración, actualización, distribución y archivo de documentos maestros que describen las especificaciones de los productos, los métodos analíticos y los PNO's.

En el área de documentación se deben resguardar por ejemplo los siguientes documentos durante el periodo de tiempo especificado según los procedimientos generales de laboratorio:

- La especificaciones que se emplean para los análisis
- El informe final de cada análisis
- Los PNO's generados en todas las áreas
- El control de los cuadernos de registro, etc.

El empleo de los cuadernos de registro es de suma importancia ya que después de realizada toda actividad, método o proceso se debe firmar y fechar por la persona que realiza la actividad y deberá llevar una segunda firma por la persona que verifica la actividad realizada, éstos cuadernos deben llevar un folio o código para poder rastrear con mayor facilidad cualquier dato, deberá indicar el título del cuaderno, la actividad que se realiza, el área en la que se utiliza, la fecha de apertura, la fecha de cierre y código anterior en caso de que aplique.

Un buen sistema de documentación, garantiza lo siguiente:

- ❖ Que los estándares de calidad sean alcanzados rutinariamente
- ❖ Se minimice los riesgos potenciales de error
- ❖ Se reduzcan los tiempos durante la investigación de desviaciones o fallas al proporcionar un acceso inmediato y organizado de los datos
- ❖ Se facilite la capacitación o entrenamiento a todos los trabajadores que realizan dichas actividades

#### **e) Normas ISO 9000; organización internacional para la estandarización.**

Las Normas ISO 9000 son un conjunto de normas de calidad establecidas por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) que se pueden aplicar a cualquier organización o empresa. Los principales beneficios de implementación son mencionados a continuación:

Reducción de rechazos e incidencias en la producción o prestación del servicio.

- Aumento de la productividad
- Mayor compromiso con los requisitos del cliente
- Mejora continua

Con base a las normas ISO 9000 la documentación permite la comunicación de un propósito y consistencia de una acción y su utilización contribuya a lograr los siguientes apartados:<sup>17</sup>

- ❖ Lograr la conformidad con los requisitos del cliente y la mejora de la calidad.
- ❖ Proveer la información adecuada
- ❖ La repetibilidad y trazabilidad de datos
- ❖ Proporcionar evidencias objetivas
- ❖ Evaluar la eficiencia y adecuación continua del sistema de gestión de calidad.

Como mencionamos con anterioridad los documentos que utiliza la gestión de calidad son: los manuales de calidad, los planes de calidad, las especificaciones, las guías, los procedimientos e instrucciones de trabajo y los registros.

# **PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN**

## VII. PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN (PNO's)

Los Procedimiento Normalizado de Operación (PNO's), se definen como documentos que contienen las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación.

La importancia de realizar PNO's radica principalmente, que en este documento se detallan todas las instrucciones paso a paso que se llevaran a cabo diariamente para ejecutar alguna actividad de forma confiable y consistente, además de ser una real recopilación de la experiencia de la personas que desempeñan el trabajo y que cumplen con su capacitación

Estos procedimientos son elaborados con los requisitos mínimos que se piden en los artículos 110 y 111 del Reglamento de Insumos para la Salud publicado por el diario oficial de la federación en 1998, los cuales indican textualmente lo siguiente:<sup>13</sup>

### Artículo 110:

Los Procedimientos Normalizados de Operación contendrán la siguiente información:

1. El objetivo: Describe la finalidad por la que se escribe el procedimiento.
2. El alcance: Se coloca el personal, elementos, áreas o departamentos a los cuales se les aplicara el procedimiento.
3. La responsabilidad: Se indica al departamento o áreas responsables de verificar que se cumpla y se lleve a cabo el procedimiento.
4. El desarrollo del proceso: Describe la actividad, técnica o análisis a realizar pasa a paso en forma enumerada, con vocabulario sencillo de manera que cualquier persona que lo lea sea capaz de desarrollar lo descrito en él.
5. Las referencias bibliográficas: Hace mención la bibliografía utilizada como apoyo en la elaboración del procedimiento

### Artículo 111:

Los procedimientos a que se refiere el artículo anterior, se firmaran por las personas que los elaboren, revisen y serán autorizados por el responsable sanitario; asimismo deberán contener un número secuencial que refleje las actualizaciones que se realicen, la fecha de emisión o de actualización y la de aplicación y cumplir con lo que establezcas la Norma correspondiente”.

Es así como se pueden diseñar algunos formatos para la elaboración de PNO's que contengan la información mínima necesaria solicitada en el Reglamento de Insumos para la Salud. Como se muestra en los esquemas 1,2 y 3.

## VIII. FORMATOS DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

### 1. Primer formato de PNO

<div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 50px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;">             LOGO DE LA EMPRESA           </div>			
<h2>NOMBRE DE LA EMPRESA</h2> <h3>CONTROL DE CALIDA MICROBIOLOGICO</h3>			
DEPARTAMENTO:	F. OFICIALIZACION	PAG:	DE:
TITULO:	No DE PROCEDIMIENTO	PROX REV.	SUSTITUYE A:
<p>1. El objetivo:</p> <p>2. El alcance:</p> <p>3. La responsabilidad</p> <p>4. El desarrollo del proceso</p> <p>5. Las referencias bibliográficas</p>			
ELABORO:	REVISO:	APROBÓ:	AUTORIZÓ:
<small>COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA</small>			

**Esquema 1. Formato de Procedimiento Normalizado de Operación<sup>14</sup>**

Fuente: Aurelio Romero Ruiz, "Elaboracion de una base de datos para el control de documentos generados en el laboratorio de Control de Calidad" 11 jun 2002.

## 2. Segundo formato de PNO

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <b>LOGO Y NOMBRE DE LA EMPRESA</b> </div>		
AREA:	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN</b>	CODIGO:
PROCEDIMIENTO PARA:	EN VIGOR: SUSTITUYE A: PROXIMA REVISION:	PAG:            DE:
ELABORADO POR:	REVISADO Y ACTUALIZADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:
<p>1. El objetivo:</p> <p>2. El alcance:</p> <p>3. La responsabilidad</p> <p>4. El desarrollo del proceso</p> <p>5. Las referencias bibliográficas</p> <p style="text-align: center; font-size: small;">COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA</p>		

**Esquema 2.** Formato de los procedimientos normalizados de operación<sup>15</sup>

Fuente: Martha García, Claudia Elizalde, "Elaboración y actualización de PNO's para los laboratorios farmacéuticos Zaragoza" 16Ago2004.

## 3. Tercer formato de PNO

<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA</b>		<b>LOGO DE LA EMPRESA</b>
<b>FOLIO DE DC</b> (Documento de cambios)	<b>FECHA DE REVISION</b>	<b>FECHA VENCIMIENTO</b>
<b>FECHA EFECTIVA</b>	<b>CODIGO Y VERSION</b>	
<b>NORMBRE DEL PROCEDIMIENTO</b>		
<p><b>I. OBJETIVO:</b></p> <p><b>II. DEFINICIONES:</b></p> <p><b>III. ALCANCE:</b></p> <p><b>IV. RESPONSABILIDAD:</b></p> <p><b>V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:</b></p> <p><b>VI. PROCEDIMIENTO:</b></p> <p><b>VII. BIBLIOGRAFÍA:</b></p> <p><b>VIII. ANEXOS</b></p>		
<b>ELABORO</b>	<b>REVISO</b>	<b>APROBO</b>
<b>FIRMA Y FECHA</b>	<b>FIRMA Y FECHA</b>	<b>FIRMA Y FECHA</b>
<b>COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA</b>		

Esquema 3. Formato de procedimiento Normalizado de Operación

Fuente: Xochitl Mozo Acevedo, 2007

## IX. COMPONENTES DE LOS FORMATOS DE PROCEDIMIENTOS

Con los formatos presentados anteriormente se realizó la siguiente tabla donde se mencionaran algunos de sus componentes, su concepto y se indicara, si éstos componentes son de carácter obligatorio u opcional.

COMPONENTE	SIGNIFICADO	OPCIONAL	OBLIGATORIO
Logo de la empresa	Representa el distintivo de la empresa	X	
Nombre de la empresa	Información de la empresa, puede estar incluido el logo.		X
Área o departamento	Nos indica el departamento o área al que pertenece	X	
Código y versión	Se define de acuerdo a las políticas de la empresa, generalmente demuestra el área al que pertenece y las actualizaciones que se realizan		X
Título del Procedimiento	Debe ser breve y directo, especifica el propósito del PNO		X
Fecha efectiva o fecha de vigencia	Corresponde a la fecha a partir de la cual el PNO es aplicado en el área de trabajo.		X
Fecha de caducidad	Fecha en la que concluye la vigencia de un PNO		X
Numero de paginas	Nos indica el numero de hojas de este PNO	X	
Folio de documento de cambios	Es el número que le asignara el área o comité que administra, verifica y hace la revisión del impacto de dicho cambio a un PNO.		X
Fecha de revisión o próxima revisión	En este apartado se muestra la fecha en la cual tendrá que aplicar un nuevo cambio	X	
Elaboro	Deberá colocar la firma fecha y nombre del Profesionista experto en realizar esta actividad.		X
Reviso	Deberá colocar firma, fecha y nombre del Profesionista supervisor o jefe de área o departamento quien verifica que todas las actividades sean correctas.		X
Aprobó	Deberá colocar firma, fecha y nombre del Profesionista jefe o gerente de área o departamento quien verifica que este documento halla pasado y aprobado por un comité de cambios.		X
Objetivo	Bosqueja la intención del documento		X
Definiciones	Se definen las palabras o acciones que no se comprendan con facilidad	X	
Alcance	Indica a que personas o departamento aplica		X
Responsabilidades	Indica que persona es la responsable de realizar dicha actividad así como a las personas responsables de verificar que la actividad se cumpla		X
Desarrollo del proceso o procedimiento	Se describen paso a paso las actividades a realizar, se describen esquemas, graficas, figuras, cálculos la documentación a emplear de manera clara.		X
Referencias bibliográficas o bibliografía	Se detallan otro documentos que nos sirven de base para describir las definiciones y el contenido del procedimiento		X
Anexos	Aquí se menciona a las graficas, tablas, esquemas, dibujos etc., que son empleados en este procedimiento.	X	

Fuente: Xochitl Mozo Acevedo, 2007

# **PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN**

PNO-CCM-01-01	Procedimiento para elaborar y/o actualizar Procedimientos Normalizados de Operación
PNO-CCM-02-01	Procedimiento para realizar cambios a procedimientos (Documento de cambios DC)

## **X. ¿COMO REALIZAR PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN?**

Considerando los componentes anteriores, tomare como base el formato de Procedimientos Normalizados de Operación mencionado en el punto VIII. con subtitulo 3.0 de este manual.

De esta forma es sumamente importante realizar un PNO en donde se mencionen las características importantes, principales y la forma de cómo deberá estar desglosada la información o contenido dentro del mismo, estos parámetros son definidos con base a las necesidades de cada empresa.

A continuación empleando el formato mencionado realizare el Procedimiento para elaborar y o actualizar procedimientos normalizados de operación.

En donde colocare los siguientes puntos:

Como logo de la empresa, colocare nuestro escudo de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Folio de DC (documento de cambios, se vera en el procedimiento numero 2 de este manual) indicare N/A ya que será una nueva emisión.

Fecha de revisión; simulare una fecha, en la cual pudo haber sido revisado este PNO, por lo regular el periodo de revisión en la empresa no debe exceder de 8 días por área que revise dicho PNO.

Fecha de vencimiento: Esta información la determina la empresa, en este caso la vigencia de un PNO deberá ser de 2 años.

Fecha efectiva: será la fecha en la cual un procedimiento que ya paso por revisión de los involucrados y el área de administración de la documentación lo hace vigente.

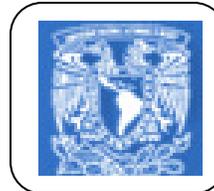
Código y versión: Es el numero consecutivo que le da la empresa a los procedimientos generados por esta área, en este caso para Microbiología será PNO-CCM-NN-VV, en donde PNO es el tipo de documento, CCM corresponderá a las siglas que identifiquen al laboratorio de Control de Calidad Microbiológico y NN será el numero consecutivo del PNO y la VV nos indicara la versión del PNO.

Por ultimo simularé firmas en el apartado de elaboró, revisó y aprobó.

Es así como comenzare a realizar 2 de los procedimientos más importantes:

- ❖ PNO-CCM-01-01 Procedimiento para elaborar y/o actualizar Procedimientos Normalizados de Operación.
- ❖ PNO-CCM-02-01 Procedimiento para realizar cambios a Procedimientos Normalizados de Operación (Documento de cambios).

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
01OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
01 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
01 NOV 07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-01-01

### PROCEDIMIENTO PARA ELABORAR Y/O ACTUALIZAR PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACION

#### I. OBJETIVO:

Proporcionar los criterios de contenido, formato y redacción para emitir o actualizar Procedimientos Normalizados de Operación (PNO's)

#### II. DEFINICIONES:

**Buenas Prácticas de Documentación** : Lineamientos y actividades relacionadas con el registro de información en los documentos que intervienen en la calidad del producto y que aseguran que fue fabricado siguiendo las Buenas Practicas de Fabricación.

**Buenas practicas de fabricación** : Conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí destinadas a garantizar que los productos farmacéuticos elaborados tengan y mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad, requeridas para su uso

**Documento de cambios (DC)**: documento en el cual se quedan establecido y evaluados los efectos potenciales de un cambio.

**Procedimiento normalizado de operación** : Documento que contiene las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación.

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento deberá aplicar a todas las áreas que requieran redactar, emitir o actualizar Procedimientos normalizados de Operación.

#### **IV. RESPONSABILIDADES:**

Es responsabilidad del área de Administración de la documentación verificar el cumplimiento de este procedimiento y asegurarse que la documentación se apegue a los lineamientos descritos en este PNO.

Es responsabilidad del área de administración de la documentación verificar que se lleve a cabo la revisión periódica de los PNO's.

Es responsabilidad del generador, actualizador, revisor y aprobador del PNO cumplir con los lineamientos que indica este PNO.

#### **V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

N/A

#### **VI. PROCEDIMIENTO:**

- 1.0 El formato del PNO será establecido por la empresa o por el Área de administración de la documentación.
- 2.0 Para la asignación de código del PNO, se utilizará una numeración alfanumérica que identifica al procedimiento y esta conformado de la siguiente manera:

PNO-CCM-NN-VV

En donde PNO es el tipo de documento, CCM corresponderá a las siglas que identifiquen al laboratorio de Control de Calidad Microbiológico, NN el numero consecutivo del PNO y la VV nos indicara la versión del PNO.

- 3.0 Administración de la documentación diseña previamente las características de la plantilla de este PNO y el emisor o actualizador solo cubrirá los puntos que son solicitados en dicha plantilla.
- 4.0 La condiciones al escribir un PNO serán las siguientes:
  - ❖ Utilizar un lenguaje sencillo y claro
  - ❖ Escribir frases cortas y comprensibles
  - ❖ Cubrir un asunto en cada paso y utilizar una secuencia lógica
  - ❖ Utilizar el verbo en infinitivo o futuro (colocar, verificar, colocará, verificará, etc.)
  - ❖ No debe presentar borraduras ni tachaduras
  - ❖ Usar abreviaturas si previamente se ha mencionado la palabra
  - ❖ Establecer en los procedimientos las actividades que requieran registro en formatos o en cuadernos de registro
  - ❖ En el caso de que se incluyan palabras en ingles se deberá colocar el significado de las siglas en español

5.0 Los Procedimientos deberán ser elaborados de acuerdo con los siguientes puntos.

-  Tipo de letra arial numero 11
-  Numeración y títulos:
-  Los capítulos se identificarán con números romanos y se escribirán con letras mayúsculas y negritas.
-  Los títulos los identificara con números arábigos y se escribirán con letras mayúsculas
-  Los subtítulos e incisos se identificaran con números consecutivos y/o viñetas
-  Ejemplo:

## V. PROCEDIMIENTO

### 1.0 TITULO

#### 1.1 Subtitulo

ó

➤ Incisos

6.0 Los PNOs deberán contener los siguientes apartados:

-  **Título:** Deberá ser conciso y se deberá verificar que no existan documentos repetidos o que puedan causar confusión
-  **Objetivo:** Establecer brevemente el propósito del procedimiento
-  **Alcance:** En listar los departamentos, áreas o gerencias a quienes aplique la información
-  **Definiciones:** Definición de cada uno de los conceptos involucrados
-  **Responsabilidades:** Establecer claramente las responsabilidades del personal y áreas involucradas en el desarrollo de las actividades
-  **Materiales, equipos y reactivos:** Enlistar los materiales, equipos o reactivos que se van a emplear durante el procedimiento.
-  **Procedimiento:** Describir de forma secuenciada los pasos a seguir e Identificar los riesgos a los que se expone el personal instalaciones, equipos, señalar las precauciones que se deben de tener para prevenir accidentes, señalar el equipo de protección personal, los limites de exposición a las sustancias y las recomendaciones adicionales que marcan las hojas de seguridad del laboratorio
-  **Bibliografía:** Anotar las referencias bibliográficas consultadas
-  **Anexos:** mencionar los anexos titulados, estos se integran al documento al finalizar referencias.

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

1. NOM 112-SSA-1-1994 Norma Oficial Mexicana, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico farmacéuticas dedicados a la fabricación de Medicamentos,
2. NOM-059-SSA1-1993 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricacion de Medicamentos.
3. PROY-NOM-059-SSA1-2003 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricacion de Medicamentos.

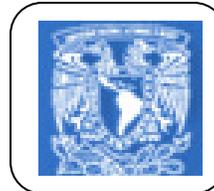
**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORO	REVISO	APROBO
X. Mozo 05OCT07	L. Acevedo 15OCT07	D. Guzmán 25OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
02 OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
02 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
02 NOV 07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-02-01

### PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR CAMBIOS A PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACION (DOCUMENTO DE CAMBIOS)

#### I. OBJETIVO:

Llevar a cabo los pasos a seguir para elaborar, generar y dar seguimiento a cambios con impacto regulatorio nacional e internacional o que afecte a las Buenas practicas de manufactura o de Laboratorio.

#### II. DEFINICIONES:

**Cambio:** toda modificación que puede o no impactar en la seguridad, calidad, pureza, potencia o concentración de un producto.

**Documento de cambios (DC):** documento en el cual se quedan establecido y evaluados los efectos potenciales de un cambio.

**Comité de cambios:** Grupo integrado por personal especializado en las áreas de Producción, tecnología de la producción, garantía de calidad y DRA (asuntos regulatorios) cuyo objetivo principal es revisar y autorizar dichos cambios.

**Generador del cambio:** Persona o área que detecta la necesidad de un cambio.

#### III. ALCANCE:

Control de Calidad Microbiológico  
Aseguramiento de Calidad  
Validación  
Producción  
DRA (Asuntos regulatorios)  
Tecnología de la Producción

**IV. RESPONSABILIDADES:**

Es responsabilidad del generador del cambio realizar la solicitud de cambios oportunamente e involucrar a las áreas correspondientes.

Es responsabilidad del generador del cambio revisar y dar seguimiento con las áreas involucradas el impacto del cambio y deberán definir en conjunto las actividades que les corresponden a dichas áreas.

Es responsabilidad del comité de cambios evaluar el cambio, archivar autorizar y dar un folio al documento que autorice dicho cambio.

**V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

N/A

**VI. PROCEDIMIENTO:**

- 1.0 Detectar la necesidad de un cambio.
- 2.0 Cuando hay una operación que no este documentada.
- 3.0 A partir de observaciones generadas en alguna auditoria.
- 4.0 Cambios en los equipos o en las áreas.
- 5.0 La oportunidad de mejora en los equipos y o técnicas.
- 6.0 Avances tecnológicos que propicien cambios en alguna técnica de análisis.
- 7.0 Por revisión o próxima actualización de un procedimiento.
- 8.0 Proceder de acuerdo con los siguientes puntos:

-  Exponer y revisar junto con el supervisor o jefe de área la propuesta de cambio, para que de el visto bueno y se realice dicha actualización.
-  Revisar junto con las áreas involucradas el impacto y las actividades que deberá realizar cada área.
-  Se deberá generar un Documento de cambios y se deberá entregar al responsable del comité de cambios para que éste documento sea evaluado y aprobado (ver anexo 1)

 El responsable del comité de cambios notificara al generador del documento de cambios el folio asignado a dicho documento el cual deberá ir en la portada del nuevo PNO.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA:**

Guidance for Industry. Changes to an approved NDA or NDA November 1999

## **VIII. ANEXOS**

Anexo 1. Documento de Cambios

## ANEXO 1

DOCUMENTO DE CAMBIOS  
(DC)FECHA DE SOLICITUD DE  
CAMBIOSFOLIO  
DE DOCUMENTO DE CAMBIOS

FECHA DE IMPLEMENTACION

AREA GENERADORA DEL DOCUMENTO DE  
CAMBIOSGENERADOR DEL CAMBIO Y JEFE DE AREA  
(NOMBRE/R.F.M./FECHA)

PNO AL QUE APLICA:	
CODIGO DE PNO:	

MOTIVO DEL CAMBIO:		
DATOS ACTUALES*	PROPUESTA DE CAMBIO	JUSTIFICACION
TITULO		
OBJETIVO		
ALCANCE		
DEFINICIONES		
RESPONSABILIDADES		
CONTENIDO DEL PROCEDIMIENTO		
BIBLIOGRAFIA		
ANEXOS		

\*INDICAR DE FORMA BREVE EL PARRAFO DONDE APLICARA EL CAMBIO

Evaluación y Autorización del cambio		
Evaluación del Comité:	SI	NO
AREAS INVOLUCRADAS	APROBADO	AUTORIZADO

AUTORIZADO POR COMITE DE CAMBIOS	
	NOMBRE/FIRMA/FECHA

ELABORÓ	REVISO	APROBO
X. Mozo 06OCT07	L. Acevedo 16OCT07	D. Guzmán 26OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## XI. FORMATO DE CAPACITACION DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

Es importante mencionar que posterior a la actualización se deberá realizar capacitación a las áreas y personas involucradas en las actividades, para esto mostraremos 2 escenarios:

1. Capacitación colectiva, es decir se reúna a un integrante de las áreas mencionadas en el alcance y se da la capacitación.
2. Capacitación individual, paso a paso; como indica el PNO se deberá capacitar al personal a la par que se realiza dicha actividad.

Es importante mencionar que al integrarse un nuevo elemento al equipo de trabajo se deberá capacitar empleando el punto 2 mencionado anteriormente. Para ello es importante emplear el siguiente formato de capacitación.

REGISTRO DE CAPACITACION EN PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN				
DEL DEPARTAMENTO: DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO				
NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO				
CODIGO:	FECHA EFECTIVA:	FECHA DE CADUCIDAD		
Nombre del colaborador	Fecha de capacitación		Firma Persona capacitada	Firma Persona Capacitadora
	Inicio	Término		

*Esquema 4. Registro de capacitación de Procedimientos Normalizados de Operación  
Fuente: Xochitl Mozo Acevedo, 2007*

Para resguardo de los procedimientos del área de microbiología así como para otras áreas es conveniente contar con una carpeta destinada para almacenamiento de PNO's, y registros de capacitación que tenga un índice y que esta identificada.

Ya que visualizamos los pasos importantes que lleva elaborar, o actualizar un procedimiento normalizado de operación, comenzaré a indicarles las áreas de las cuales se compone el área de control de calidad microbiológica y posteriormente les indicaré algunos de los procedimientos más usuales e importantes que se deben cumplir en este laboratorio.

## **XII. AREAS DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA**

El departamento de Microbiología deberá contar como mínimo con las siguientes áreas:

- ❖ Área Limpia
- ❖ Área de registros
- ❖ Área de equipos e instrumentos
- ❖ Área de lavado de material
- ❖ Área de Almacén de medios de cultivo y reactivos
- ❖ Área estéril o aséptica

A continuación mencionaremos algunas de las características de las áreas mencionadas.

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

Las superficies de cada área deberá ser de forma tal que permita la instalación de los equipos e instrumentos fijos que se requieran, dejando espacio suficiente con la finalidad de que el personal trabaje cómodamente y se lleven a cabo con facilidad los servicios de limpieza y mantenimiento necesarios.

Las áreas deben estar ventiladas mediante accesos de aire colocados estratégicamente, cuando sea necesario con aire acondicionado, con humedad relativa y temperaturas controladas, deben tener iluminación adecuada para el correcto desempeño del trabajo.

Los acabados de todas las áreas deberán ser terminados lisos para paredes, techos y pisos, las uniones deberán ser redondeadas con acabado sanitario para evitar la contaminación o acumulación de polvo y deberá mantener las condiciones de seguridad e higiene adecuadas.

En el área de microbiología se recomienda tener cuartos limpios o zonas aisladas en donde se instalen las campanas de flujo laminar, etc. Se debe contar con zonas para autoclave, estufas de cultivo, hornos de esterilización, etc. se deberá contar con medios adecuados de extracción para evitar la acumulación de calor.

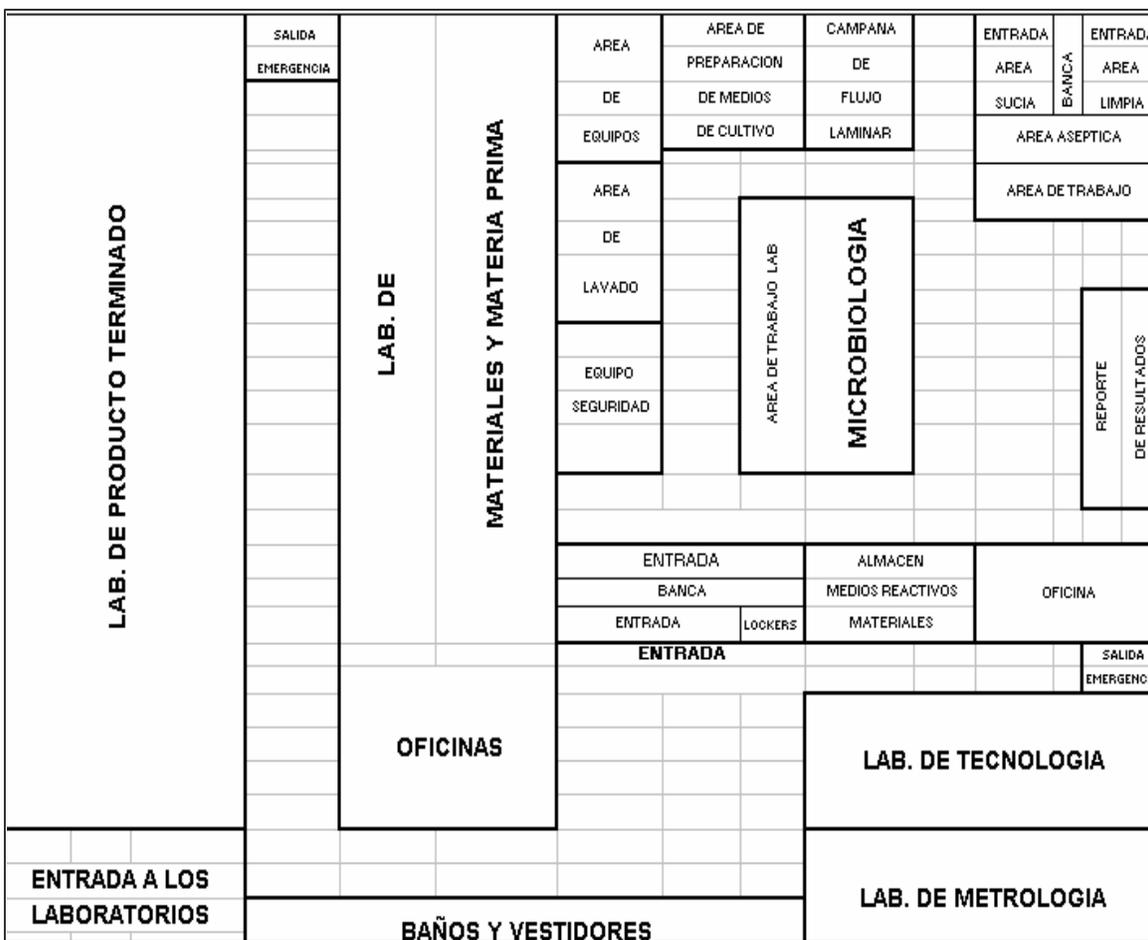
La zona de lavado deberá contar con una zona de recepción de materiales sucios que será conveniente dividirla en zona de recepción de material contaminado antes de que este llegue a la zona de recepción de material sucio. En el área en donde se lleve a cabo el lavado del material se deberá contar con tarjas de acero inoxidable dotadas de agua fría y agua caliente, además de contar con servicios de agua purificada para los enjuagues finales.

La zona de almacenamiento podría estar dividida en almacenamiento de materiales, de reactivos y de instrumentos.

El Área limpia de Microbiología puede ser aquella donde se realicen lectura de placas, valoraciones microbiológicas, reto a sanitizantes, resiembras, etc.

Las áreas asépticas o estéril deberá de tener como mínimo área sucia, área limpia, esclusa de luz UV, campana e flujo laminar para realizar los análisis debe contar con una esclusa que conecte al autoclave para uniformes y material empleado para ésta, debe contar con filtros HEPA y un sistema de inyección y extracción de aire.

El área aséptica de microbiología se deberá validar para generar un ambiente apropiado para el manejo de muestras que en ellas se realiza, de acuerdo a las especificaciones establecidas por la empresa y a la normatividad mexicana vigente para las buenas prácticas de fabricación como es la NOM-059:SSA-1 1993, a la guía de practicas adecuadas de manufactura para cuartos limpios 1989, Microbiological evaluation of clearrooms and other controlled enviroments 1995.



Esquema 5. Plano del laboratorio de Microbiología

Fuente: Xochitl Mozo Acevedo, 2007

# PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

PNO-CCM-03-01	Procedimiento para el vestido y desvestido del área estéril
PNO-CCM-04-01	Procedimiento para la operación del autoclave
PNO-CCM-05-01	Procedimiento para la limpieza de hornos e incubadoras
PNO-CCM-06-01	Procedimiento para la preparación de reactivos, soluciones y medios de cultivo
PNO-CCM-07-01	Procedimiento para sembrar por el método de dilución y el método de aislamiento por estría
PNO-CCM-08-01	Procedimiento para la técnica de vaciado en caja
PNO-CCM-09-01	Procedimiento para el control de calidad de los medios preparados
PNO-CCM-10-01	Procedimiento para la promoción de crecimiento
PNO-CCM-11-01	Procedimiento para la identificación de microorganismos
PNO-CCM-12-01	Procedimiento para la tinción de Gram.
PNO-CCM-13-01	Procedimiento para la tinción de esporas
PNO-CCM-14-01	Procedimiento para el límite microbiano de materia prima
PNO-CCM-15-01	Procedimiento de control ambiental
PNO-CCM-16-01	Procedimiento para la toma de muestra del personal
PNO-CCM-17-01	Procedimiento para la toma de muestra de aire filtrado
PNO-CCM-18-01	Procedimiento para el muestreo y análisis microbiológico de aguas

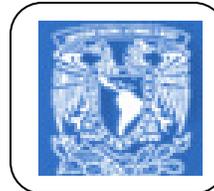
### **XIII. PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA**

Es así como conociendo la importancia de la Microbiología, las normas que debemos aplicar, la documentación adecuada y las características de las instalaciones en la industria farmacéutica, procederé a elaborar los procedimientos normalizados de operación más usuales que se emplean en el laboratorio de control de calidad microbiológico.

Empleare el formato de Procedimientos descrito anteriormente en el formato 3 mencionado en el punto VII. Formatos de procedimientos Normalizados de Operación y mencionare los puntos más importantes que deben contener los procedimientos., de acuerdo con lo descrito en los artículos 110 y 111 del Reglamento de Insumos para la salud y las normas mexicanas que aplican a cada uno de ellos, añadiendo o seccionando algunos puntos más como son: definiciones, materiales, equipos, reactivos y anexos, los cuales nos ayudaran mejor a comprender el diseño de los procedimientos.

Es aquí donde comencare a realizar procedimientos que se emplearan en el laboratorio de microbiología.

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
03 OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
03 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
03 NOV 07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-03-01

### PROCEDIMIENTO PARA EL VESTIDO Y DESVESTIDO DEL AREA ESTERIL

#### I. OBJETIVO:

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

#### II. DEFINICIONES:

**Área aséptica.** Zona comprendida dentro de una área limpia, diseñada y construida para minimizar la contaminación por partículas viables y no viables, manteniéndola dentro de límites preestablecidos

#### III. ALCANCE:

Aplica al personal que ingresa al área aséptica  
Microbiología  
Jefatura de control de calidad

#### IV. RESPONSABILIDADES:

Es responsabilidad del personal técnico y Químico del área de microbiología, aplicar este procedimiento conforme a lo indicado.

Es responsabilidad del supervisor de microbiología verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta

Es responsabilidad del jefe de control de calidad verificar que este procedimiento se lleve a cabo de forma correcta.

## V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

N/A

## VI. PROCEDIMIENTO:

### 1.0 VESTIDO

- 1.1 Pasar del "área sucia" donde se quitara la ropa exterior: bata, ropa de calle, zapatos y se colocara una bata y sandalias para cruzar la banca hacia el área limpia.
- 1.2 Sanitizar manos y sandalias con alcohol al 70%.
- 1.3 Dentro del área limpia se colocara zapatos y un uniforme para poder ingresar al área aseptica.
- 1.4 Romper la envoltura del uniforme y tomar la escafaldra por la parte interna a la altura de la barbilla y nuca, realizando el adecuado amarre de los listones hacia la nuca.
- 1.5 Tomar el overol a la altura de la cintura, por la parte interna, introducir una pierna tras otra tratando de no tocar el piso y/o la parte exterior del uniforme.
- 1.6 Tomar una de la mangas por la parte inferior a la altura de puño y pasar el brazo de tal forma que se coloque en posición normal, hacer la misma operación con el otro brazo y cerrar el overol.
- 1.7 Colocar los zapatonos de tal forma que al introducir el pie, estos queden correctamente puestos.
- 1.8 Observese en el espejo para verificar la correcta posición del uniforme.
- 1.9 Romper la envoltura de los guantes y colocarlos de tal forma que cubra los puños de las mangas del uniforme y éstos queden en la parte interna de los guantes.

**Nota:** En todo el proceso de vestido no se debe tener contacto con la parte exterior del uniforme.

### 2.0 DESVESTIDO

- 2.1 Dirigirse al vestidor recoja la envoltura del uniforme.
- 2.2 Ingrese al área sucia
- 2.3 Retire lentamente los guantes de seguridad
- 2.4 Desamarre las cintas de la bota derecha y deberá quitársela lentamente mente doblándolo hacia dentro, realice el mismo procedimiento con la bota izquierda, posteriormente retire los zapatonos desechable y colóquelos dentro del la envoltura del uniforme.
- 2.5 Baje el cierre del overol y despojase del uniforme sacando los brazos y comience a doblarlos hacia dentro hasta concluir en las extremidades inferiores.

- 2.6 Retire los lentes de seguridad.
- 2.7 Desamarre las cintas de la escafandra y deberá retirarla lentamente por los extremos exponiendo solo la parte externa.
- 2.8 Coloque dentro de la escafandra el overol y las botas para llevarlas posteriormente al área asignada para su lavado.
- 2.9 Proceda al vestido con su uniforme de trabajo cuidando en todo momento la lentitud de su movimiento y de no sacudir la ropa.
- 2.10 Salga del área sucia, llevando consigo los lentes de seguridad y la envoltura de su uniforme.
- 2.11 Deberá dirigirse al área de lavado y retire la cofia, cubre bocas, guantes y deséchelos así como la envoltura del uniforme.
- 2.12 Deberá sanitizar perfectamente los lentes de seguridad con alcohol etílico al 70% ayudándose con un paño estéril y especial par las áreas asépticas, colóquelos en la esclusa de luz UV durante 20 minutos

## VII. BIBLIOGRAFÍA:

NOM-059-SSA1-1993 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de Medicamentos.

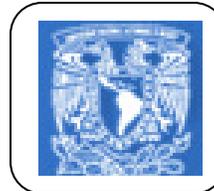
## VIII. ANEXOS

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 06OCT07	L. Acevedo 16OCT07	D. Guzmán 26OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
04 OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
04 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
04 NOV 07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-04-01

### PROCEDIMIENTO PARA LA OPERACIÓN DEL AUTOCLAVE

#### I. OBJETIVO:

Establecer los pasos a seguir para la adecuada operación del autoclave asegurando la esterilización por calor húmedo del material limpio, medios de cultivo, material limpio y contaminado, etc.

#### II. DEFINICIONES:

**Esterilización:** proceso físico o químico que destruye toda forma de vida de vida microbiana, incluidas las esporas.

**Esterilización con calor húmedo:** (vapor de agua) es mucho más rápida y eficaz que el calor seco debido a que las moléculas de agua desnaturalizan las proteínas de forma irreversible mediante rotura de los uniones H entre los grupos peptídico a temperaturas relativamente bajas.

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicable al área de control microbiológico.

#### IV. RESPONSABILIDADES:

Del químico analista del área de microbiología seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

Del supervisor del área verificar que este procedimiento se lleve a cabo.

## V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Autoclave
- Material a esterilizar

## VI. PROCEDIMIENTO:

- 1.0 Verificar que las valvulas del autoclave se encuentren cerradas.
- 2.0 Llenar de agua hasta donde marca el nivel, e introducir la canastilla en la camara.
- 3.0 Colocar el material a esterilizar teniendo cuidado de que en la parte inferior de la camara este colocada la rejilla de protección de las resistencias.
- 4.0 Poner un poco de talco en el empaque y cerrar la tapa, apretar las mariposas.
- 5.0 Cerciorarse de que la posición de la perilla del switch este en apagado entes de conectar la corriente.
- 6.0 Coloque la perilla en posición de alto para obtener el menor tiempo posible en el proceso de esterilización.
- 7.0 Observar cuando empiece a escaparse el vapor por la valvula de seguridad (aprox. entre 25 y 30 minutos), la presión y la temperatura; una vez que alcanzo ésta misma se empieza a tomar el tiempo según sean las necesidades.
- 8.0 Para material sucio 30 minutos, para material limpio 20 minutos y para medios de cultivo 15 minutos.

**Nota:** En cada carga de esterilización se debe usar un bioindicador, el cual se evalua hasta su etapa final (cada autoclave tiene sus propias instrucciones).

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

Guía de Validación de medios de cultivo,1990. Comité Nacional de Validación.

**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 05OCT07	L. Acevedo 15OCT07	D. Guzmán 2OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambio s)  
N/A

FECHA DE REVISION  
06 OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
06 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
06 NOV 07

CODIGO Y VER SION  
PNO-CCM-05-01

### PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA DE HORNOS E INCUBADORAS

#### I. OBJETIVO:

Mantener en condiciones óptimas de operación los hornos e incubadoras.

#### II. DEFINICIONES:

N/A

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de control microbiológico.

#### IV. RESPONSABILIDADES:

Del químico analista del área de microbiología seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

Del supervisor del área verificar que este procedimiento se lleve a cabo.

#### V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Etanol al 70%
- Franela o gamuza
- Brocha

**VI. PROCEDIMIENTO:**

- ❖ Retirar cualquier material que se encuentre dentro del equipo.
- ❖ Verificar que el equipo este completamente apagado y desconectado.
- ❖ Con una franela o gamuza frotar las paredes del equipo, hasta que se haya eliminado totalmente el polvo.
- ❖ Con una brocha de cerdas suaves, limpiar las superficies de los equipos.
- ❖ Pasar el trapo o gamuza, previamente humedecida con etanol al 70%.
- ❖ Repetir el paso anterior las veces necesarias, hasta que el interior del equipo se encuentre perfectamente limpio.
- ❖ Verificar que la cámara de los equipos quede perfectamente limpia y libre de materiales extraños.
- ❖ Por último conectar los equipos a la corriente eléctrica y verificar la temperatura de operación.

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

Elaboración y actualización de PNO's para los laboratorios farmacéuticos Zaragoza. Martha García, Claudia Elizalde. 16Ago2004.

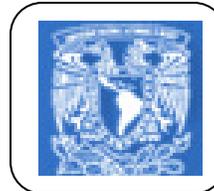
**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 08OCT07	L. Acevedo 18OCT07	D. Guzmán 28OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
06 OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
06 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
06 NOV 07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-06-01

### PROCEDIMIENTO PARA PREPARACION DE REACTIVOS SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

#### I OBJETIVO:

Establecer los pasos a seguir para la preparación de medios de cultivo y soluciones empleados en los diferentes análisis microbiológicos.

#### I. DEFINICIONES:

**Medios líquidos:** se emplean para cultivar los microorganismos y obtener grandes cantidades de los mismos o bien la producción de metabolitos específicos, estimular y promover la selección de algún o algunos microorganismos e impedir que otros se multipliquen.

**Medios semisólidos:** se utilizan para identificaciones bioquímicas y averiguar si el germen estudiado es móvil, estos medios tienen una consistencia blanda.

**Medios sólidos:** se utilizan para obtener colonias aisladas de microorganismos.

**Medios selectivos:** son medios sólidos que contienen sustancias que impiden el desarrollo de algunos microorganismos, pero en una flora mixta permiten el aislamiento y recuperación del germen o grupo de germen de interés.

**Medios diferenciales:** Son aquellos que contienen indicadores de ácido base, redox o sustancias que detectan cambios en el medio o producen condiciones específicas en el mismo.

**Medios enriquecidos :** son los que favorecen en general el desarrollo de los microorganismos.

**Medios múltiples:** son medios que tienen incluidas sustancias que nos permiten determinar una prueba bioquímica. Usualmente dichos medios contienen dos o más pruebas al mismo tiempo.

## II. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de microbiología

## III. RESPONSABILIDADES:

Es responsabilidad de los analistas la correcta y completa realización de este procedimiento, así como informar de cualquier desviación en las especificaciones.

## IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Balanza
- Potenciómetro
- Autoclave
- Refrigerador
- Matraces Erlenmeyer
- Espátula
- Micro pipetas y pipetas graduadas y volumétricas
- Probetas
- Agua desionizada
- Aditivos
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Cajas de petri estériles

Ver anexo 1 de este manual

## V. PROCEDIMIENTO:

### 1.0 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

1.1 En una balanza calibrada pesar cuidadosamente y con precisión la cantidad de medio de cultivo deshidratado requerido, tapar el frasco y regresarlo a su lugar.

1.2 A la cantidad pesada del medio de cultivo deshidratado se añade a una pequeña cantidad de agua destilada o desmineralizada fría y se distribuye uniformemente por agitación.

- 1.3 Añadir la cantidad restante de agua y se va balanceando el recipiente de vidrio hasta la completa homogeneización del granulado o del polvo.
- 1.4 Reposar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente los medios de cultivo que contienen el Agar para que este pueda aumentar el volumen del medio, para disolver completamente los medios de cultivo deben calentarse en baño maría a más de 95° C.
- 1.5 Los medios de cultivo disueltos se esterilizan en autoclave. La duración del calentamiento no debe ser excesiva para así evitar una disminución de la calidad.

Nota: El azúcar se carameliza en un calentamiento prolongado y da un color pardo al sustrato. En caso de sustratos que contengan bilis natural puede producirse un cambio de color, transformando los pigmentos biliares en sus productos de oxidación amarillos. Los glicoprotéicos aparecen como precipitado blanco. Ciertas sustancias químicas tienden a evaporarse o destruirse en un calentamiento prolongado. Estas modificaciones pueden evitarse observando estrictamente las instrucciones de preparación.

## **2.0 MEDIR EL PH AL MEDIO DE CULTIVO**

- 2.1 Los medios de cultivo deshidratados están normalmente ajustados en su pH de tal manera que no es necesario corregirlos.
- 2.2 En caso de conservación inadecuada, en particular de sustratos con un contenido elevado en hidratos de carbono, puede disminuir el pH, de ser así se ajusta con soluciones de NaOH (hidróxido de sodio) o HCl (Ácido Clorhídrico).
- 2.3 Para ciertos medios de cultivo se recomienda la utilización de carbonato sódico, de ácido cítrico, de ácido tartárico o de ácido láctico en solución al 10%
- 2.4 El pH debe medirse antes de la esterilización.

## **3.0 ESTERILIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO**

- 3.1 Se debe esterilizar el medio de cultivo como indica el anexo 1 de este procedimiento.
- 3.2 Después de la esterilización, el medio, todavía líquido o de nuevo licuado, se vierte a una temperatura de 50-60° C en las cajas de petri estériles.
- 3.3 La capa de las placas debe tener un espesor entre 3 y 4mm, es decir, que 15mL de sustrato son suficientes para cajas de petri de 9cm. de diámetro.
- 3.4 Para las determinaciones de actividad de antibióticos se utilizan 12mL del sustrato más 3mL del microorganismo.

3.5 Para la preparación del agar inclinado, el medio de cultivo líquido se deberá pipetear los tubos de ensayo.

3.6 Los medios de cultivo deben sacarse del refrigerador una hora antes de su empleo.

NOTA: Ver el anexo 1 de este manual, ya que se detalla la preparación son los reactivos, soluciones y medios de cultivo empleados.

#### VI. BIBLIOGRAFÍA:

1.0 Norma oficial Mexicana, que establece las especificaciones sanitarias de los Medios de Cultivo NOM-065-SSA-1-1993

2.0 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8<sup>a</sup> Ed 2004 Tomo 1 y 2

3.0 Clavell, L. Pedique de Aulacio M. 1992 Microbiología. Manual de metodos generales 2<sup>a</sup> Edicion. Facultad de farmacia. Universidad central de Venezuela.

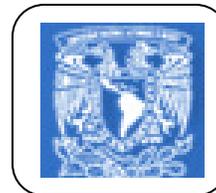
#### VII. ANEXOS

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 09OCT07	L. Acevedo 19OCT07	D. Guzmán 29OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
07 OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
07 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
07 NOV 07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-07-01

### PROCEDIMIENTO PARA SEMBRAR POR EL METODO DE DILUCION Y EL METODO DE AISLAMIENTO POR ESTRIA

#### I. OBJETIVO:

Describir la técnica de sembrado para llevar al aislamiento de colonias, utilizando el método de estría y el método de extensión.

#### II. DEFINICIONES:

**Sembrar o inocular:** es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, hisopo o pipeta estéril.

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de microbiología

#### IV. RESPONSABILIDADES:

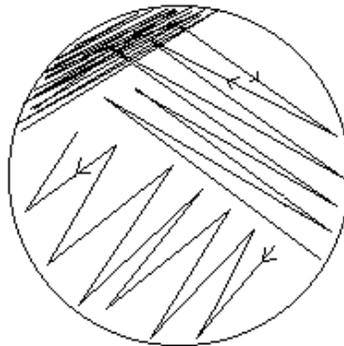
Es responsabilidad de los analistas la correcta y completa realización de este procedimiento, así como informar de cualquier desviación en las especificaciones.

#### V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

Placas con medio de cultivo gelificado.  
Asas de inoculación  
Mechero de bunsen  
Alcohol al 70 %

**VI. PROCEDIMIENTO:****1.0 MÉTODO DE AISLAMIENTO POR ESTRÍA.**

- 1.1 Flamear al rojo vivo el asa de inoculación.
- 1.2 Enfriar el asa introduciendo al agar, en el que se va a realizar el sembrado.
- 1.3 Tomar una asada de la colonia o del medio liquido según sea la procedencia del inculo
- 1.4 Poner el inculo en el centro de la placa
- 1.5 Extenderlos sobre el medio realizando movimientos hacia los lados
- 1.6 Deslizar el asa poco a poco hacia abajo para cubrir toda la placa. (Ver figura 1)
- 1.7 Poner la tapa de la placa de petri, dejar secar 30 minutos antes de invertir la placa.
- 1.8 Incubarla a las condiciones requeridas dependiendo del medio de cultivo.



**Figura 1. Aislamiento por estría**

**2.0 METODO DE DILUCION:**

- 2.1 Flamear al rojo vivo el asa de inoculación.
- 2.2 Enfriar el asa introduciéndola en el agar en el que se va a realizar el sembrado
- 2.3 Tomar una asada tomada de la colonia o del medio liquido, según sea la procedencia del inóculo.
- 2.4 Poner el inóculo cerca del borde de la placa y extender
- 2.5 Flamear el asa y realizar un extensión desde de un área a otra en estrías paralelas, cuidando de no dejar que se encimen las estrías.
- 2.6 Flamear el asa y repetir en la siguiente zona y así sucesivamente
- 2.7 Poner la tapa de la caja de petri, dejar secar 30 minutos antes de invertir la placa.
- 2.8 Incubarla a las condiciones requeridas de acuerdo con el medio empleado.

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

Cano, R. Sara. 2006. Métodos de análisis Microbiológico, NORMAS ISO, Consultora.

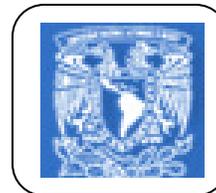
**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORO	REVISO	APROBO
X. Mozo 10OCT07	L. Acevedo 10OCT07	D. Guzmán 30OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
08OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
08 NOV 09

FECHA EFECTIVA  
08NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-08-01

### PROCEDIMIENTO PARA LA SIEMBRA POR TECNICA DE VACIADO EN PLACA

#### I. OBJETIVO:

Describir la técnica de vaciado en caja para estimar el contenido microbiano de las muestras.

#### II. DEFINICIONES:

**Técnica por vaciado en placa:** técnica de cultivo para el recuento microbiano a base de cultivos con formación de colonias.

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de microbiología

#### IV. RESPONSABILIDADES:

Es responsabilidad de los analistas la correcta y completa realización de este procedimiento, así como informar de cualquier desviación en las especificaciones

#### V. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS:

Cajas petri estériles  
Pipetas estériles  
Medios de cultivo preparados y esterilizados

**VI. PROCEDIMIENTO:**

- 1.0 En condiciones de esterilidad
- 2.0 Tomar con una pipeta estéril un mililitro del inculo.
- 3.0 Vaciar el inculo en una caja petri estéril
- 4.0 Adicionar aproximadamente 18ml del medio esterilizado (45-50°C) en la caja petri
- 5.0 Rotar cuidadosamente hasta mezclar el inculo con el agar uniformemente.
- 6.0 Dejar solidificar y voltear las cajas petri
- 7.0 Incubar las cagas el tiempo y a la temperatura indicadas

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.0 NOM-092-SSA-1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- 2.0 LIM. 1998 Microbiology Mc Graww Hill Estados Unidos.

**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORO	REVISO	APROBO
X. Mozo 11OCT07	L. Acevedo 16OCT07	D. Guzmán 29OCT07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
09OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
09NOV09

FECHA EFECTIVA  
09NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-09-01

### PROCEDIMIENTO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS PREPARADOS

#### I. OBJETIVO:

Establecer los pasos a seguir para tener control de calidad en los medios de cultivos preparados.

#### II. DEFINICIONES:

N/A

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de microbiología

#### IV. RESPONSABILIDAD:

Del químico analista del área de microbiología seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar la correcta y completa capacitación de este procedimiento

## V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Estufa de vacío
- Pesafiltros
- Espátula
- Balanza
- Asas bacteriológicas
- Cajas petri estériles
- Pipetas graduadas estériles
- Tubos de ensayo
- Inoculos de referencia
- Desecador
- Refrigerador

## VI. PROCEDIMIENTO:

### 1.0 PRUEBA DE ESTERILIDAD

Es aplicable a cada lote de medio fabricado. Se recomienda someter a esta prueba el 4% de las unidades preparadas incubando a 35-37° C, de 24 a 48 horas o bien a 20-25° C de 5 a 7 días, en una incubadora previamente validada.

#### Resultado

Se reporta como cumple o no cumple con la prueba de esterilidad. Para demostrar que cumple con la prueba de esterilidad, no debe de existir crecimiento de ningún microorganismo.

### 2.0 HUMEDAD

Se aplica a cada medio de cultivo deshidratado antes de iniciar su uso analítico.

- 📖 En cámara de vacío colocar el pesafiltros durante un periodo de 2 horas.
- 📖 Transcurrido este tiempo llevar el pesafiltros a un desecador durante 15 minutos.
- 📖 Talar el pesafiltro, anotar la lectura, adicionarle una pequeña cantidad de medio de cultivo con ayuda de una espátula, poner en la balanza y tomar nuevamente la lectura.
- 📖 Posteriormente llevar a la estufa de vacío durante 2 horas.
- 📖 Transcurrido este tiempo llevar a el desecador durante 15 minutos, poner en la balanza y tomar la lectura.

#### Resultado

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 1}} \times 100$$

### 3.0 CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE MEDIOS PREPARADOS.

- 3.1 Esto aplica a cada lote de medios fabricados. Cada vez que se prepare algún medio de cultivo.
- 3.2 Este sera vaciado en sus respectivas cajas, se dejaran dos cajas de medio de cultivo:
- 3.3 Una como control positivo, otra como control negativo.
- 3.4 A el control positivo se le inocula con una asada de la suspensión de un microorganismo el cual puede ser *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*, que nos de 10 a 100 UFC/ml.
- 3.5 Incubarlo 24 horas a una temperatura de 35+/-2°C.
- 3.6 El control negativo, simplemente se incuba ala misma temperatura y tiempo que las demás placas.

#### Resultados

Estos son reportados en sus bitacoras correspondientes si cumplen o no cumplen.

### VII. BIBLIOGRAFÍA:

- 1.0 Norma oficial Mexicana, que establece las especificaciones sanitarias de los Medios de Cultivo NOM-065-SSA-1-1993
- 2.0 Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección general de Insumos para la salud, S.S.A., 1990.
- 3.0 Cuesta. I. Alicia. Norma ISO 17025 Medios de cultivo y reactivos.

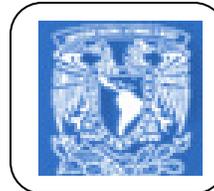
### VIII. ANEXOS

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBO
X. Mozo 12OCT07	L. Acevedo 17OCT07	D. Guzmán 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
10OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
10NOV09

FECHA EFECTIVA  
10NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-10-01

### PROCEDIMIENTO PARA LA PROMOCION DE CRECIMIENTO

#### I. OBJETIVO:

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

#### II. DEFINICIONES:

Los microorganismos empleados en las pruebas de promoción de crecimiento deben estar identificados con la clave del cepario de procedencia.

Los medios de cultivo selectivos y diferenciales como el agar EMB (agar eosina azul de metileno) deben probarse con un microorganismo que fermente la lactosa; por ejemplo *E. coli*, uno que no la fermente; por ejemplo *Salmonella sp* y otro que sea inhibido; por ejemplo *S. aureus*.

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de microbiología

#### IV. RESPONSABILIDADES:

Del químico analista del área de microbiología seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar que este procedimiento se lleve a cabo.

**V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

- Medios de cultivo deshidratados
- Material de vidrio (pipetas, matraces, etc)
- Asas bacteriologicas
- Cepas de referencias y cepas recién aisladas
- Microscopio
- Espectrofotometro
- Contador de colonias
- Balanza
- Potenciometro
- Incubadoras
- Autoclaves
- Termómetros
- Pipetas graduadas de 1 ml
- Refrigerador
- Horno
- Solución salina estéril
- Equipo de tinción de gram
- Reactivos para pruebas bioquimicas

**VI. PROCEDIMIENTO:**

- 1.0 Primeramente se prepara y estandariza el inculo.
- 2.0 Para los medios de cultivo líquidos, preparar un volumen determinado del o de los medios de cultivo a probar.
- 3.0 A cada uno de los tubos o recipientes que contienen el medio de cultivo, adicionar 1.0 ml de la suspensión para la cuenta en placa, con el fin de confirmar la viabilidad y recuperación del inculo

**Resultado:**

Si los tubos o recipientes que contienen el medio de cultivo inoculado presentan turbidez y la cuenta de la placa es la esperada la prueba de promoción de crecimiento es correcta.

Si no se presenta desarrollo de los medios de cultivo líquidos y la cuenta en placa es correcta, el lote de medio de cultivo se aprueba para su uso.

Si no se presenta desarrollo en los medios líquidos, ni en las placas, debe verificarse la viabilidad de los inoculos empleados y repetir la prueba.

Siempre que el crecimiento sea positivo debe verificarse que se trate del microorganismo de prueba y no el de contaminación.

Mediante la técnica de **Miles-Mischra** se puede demostrar la capacidad de promoción de crecimiento y las propiedades selectivas y diferenciales de los medios de cultivo de la manera siguiente:

- 1.0 Preparar los medios de cultivo a probar siguiendo estrictamente las condiciones de su preparación.
- 2.0 En la zona aséptica, vaciar aproximadamente 15 ml de medio de cultivo en cajas petri y dejar solidificar.
- 3.0 Eliminar el exceso de humedad dejando las cajas ligeramente abiertas a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ , en un periodo máximo de 3 horas.
- 4.0 Dividir y marcar el fondo de cada placa en 3 segmentos.
- 5.0 Con asas calibradas de 0.01 ml ó de 0.02 ml de la dilución del microorganismo de prueba que contiene aproximadamente 1000 UFC/ml.

Cada segmento se inoculara con los siguientes microorganismos:

- ▶ ***E. coli***, el cual es fermentador de lactosa.
- ▶ ***Salmonella sp***, no es fermentador de la lactosa.
- ▶ ***S. aureus***, no debe crecer.

Al mismo tiempo correr la prueba en TSA (Agar soya tripticaseina) en las condiciones señalada para verificar el número de microorganismos viables.

#### Resultados

Si los medios de cultivo permiten el crecimiento de los microorganismos de prueba y además presentan las características morfológicas y fisiológicas esperadas los lotes de medios de cultivo se aprueban para su uso.

Si el o los medios de cultivo de prueba no presentan desarrollo y este se manifiesta en las placas testigo, el medio de cultivo no debe utilizarse.

Si los medios de cultivo permiten el crecimiento de los microorganismos de prueba, pero estos no expresan las características morfológicas y fisiológicas esperadas, el medio de cultivo no debe emplearse para estos fines.

Si el número de microorganismos encontrados en los medios de prueba no corresponden al esperado (50-75% de recuperación frente al medio control TSA) el medio de cultivo no debe aprobarse para su uso.

En todos los casos debe comprobarse que el crecimiento correspondan a los microorganismos de prueba y no a contaminantes.

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.0 Norma Oficial Mexicana. Estabilidad de farmacos y medicamentos. NOM-073-SSA1-2005. 04 Enero 2006.
- 2.0 Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección general de Insumos para la salud, S.S.A., 1990

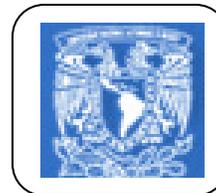
**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 12OCT07	L. Acevedo 17OCT07	D. Guzmán 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)

FECHA DE REVISION  
11OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
11NOV09

FECHA EFECTIVA  
11NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-11-01

### PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### I. OBJETIVO:

Determinar los pasos a seguir para la determinación de microorganismos patógenos.

#### II. DEFINICIONES:

**Microorganismos objetables:** son aquellos patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Escherichia coli*) que podrían presentarse en un producto o materia prima y que debemos detectar mediante la utilización de medios selectivos o enriquecidos para poder dar un dictamen final de la prueba de ausencia o presencia los cuales varían de una forma farmacéutica a otra; ya que estos medicamentos en lugar de mejorar la salud pueden dañar.

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicable al área de microbiología.

#### IV. RESPONSABILIDADES:

Del químico analista del área de microbiología seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar que se tenga la capacitación para que este procedimiento se lleve a cabo.

## V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Medios de cultivo deshidratados
- Material de vidrio (pipetas, matraces, etc)
- Asas bacteriologicas
- Microscopio
- Contador de colonias
- Balanza
- Potenciometro
- Incubadoras
- Autoclaves
- Termómetros
- Pipetas graduadas de 1 ml
- Refrigerador
- Horno
- Solución salina estéril
- Equipo de tinción de gram
- Reactivos para pruebas bioquimicas

## VI. PROCEDIMIENTO:

### 1.0 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Identificación de *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

- 📖 Pesar o medir 10 ml o 10 g de la muestra y adicionarlos en 90 ml de medio de CST (caldo soya tripticaseina), mezclar e incubar.
- 📖 Tomar un inculo del cultivo anterior y aislar por estria cruzada en alguno de los siguientes medios; Agar de Sal y Manitol, Agar BairdParker o Agar Vogel Johnson para identificación de *Staphylococcus aureus* y el medio Agar Cetrimida para *Pseudomons aeruginosa*, el medio agar MacConkey para *Echerichia coli* y Agar verde Brillante para *Salmonella, sp.*
- 📖 Incubar y observar la morfología colonial del desarrollo obtenido realizando una tinción de Gram y compararla con las tablas No. 1, 2, 3 y 4 que estan citadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004 Tomo 1 y 2 y que se mecionan a continuacion (Ver VIII. Anexos)

Si la morfología colonial no corresponde a la descrita se concluye que la muestra esta libre de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* pero si las características son similares se realizan las siguientes pruebas:

## 2.0 PRUEBA DE COAGULASA PARA *Staphylococcus aureus*.

- 📖 Transferir una porción de la colonia sospechosa al medio caldo soya triticaseina (CST) e incubar durante 24 horas.
- 📖 Colocar 0.1ml de cultivo en un tubo conteniendo 0.5 ml de plasma fresco de conejo o cobayo.
- 📖 Incubar a 37°C y observar cada 3 horas hasta completar las 24 horas.

Nota: La prueba se da como positiva si se observa coagulación del plasma.

En esta prueba se deben utilizar cepas de referencia de ***Staphylococcus aureus***, prueba de oxidasa y desarrollo de pigmentos producidos por ***Pseudomonas aeruginosa***.

En caso de que el medio Agar Cetrimida se encuentren colonias sospechosas de ***Pseudomonas aeruginosa***, sembrarlas en cada uno de los medios de agar para detección de fluorescencia y agar de ***Pseudomonas*** para detección de pirocinas, incubar a 35°C durante no menos de 3 días, observar con luz ultravioleta las colonias resultantes y compararlas con las descritas en las tablas mencionadas anteriormente.

## 3.0 PRUEBA DE OXIDASA

Cuando en cualquiera de los medios se encuentren colonias sospechosas de ***Pseudomonas aeruginosa*** realizar la prueba de oxidasa de la siguiente manera:

- 📖 Impregnar una tira de papel filtro de Diclorohidrato de N-N Dimetil P-Fenilendiamina al 1% y sobre ella colocar una porción de la colonia sospechosa.
- 📖 La prueba es positiva si se produce un color purpura en los 10 segundos siguientes.
- 📖 Emplear como control positivo una tira de papel filtro impregnada con Diclorohidrato de N-N Dimetil P-Fenilendiamina al 1% y sobre ella una cepa de referencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.
- 📖 Dejar como control negativo una tira de papel filtro impregnada con Diclorohidrato de N-N Dimetil P-Fenilendiamina al 1%.

## 4.0 PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*.

- 📖 Colocar 10 ml ó 10 g de muestra en 90 ml de medio Caldo Lactosado e incubar. Si se observa crecimiento, sembrar 1 ml de cultivo a los siguientes medios de enriquecimiento:
  - ▶ Caldo Selenito
  - ▶ Caldo Tetrionato
- 📖 Mezclar e incubar durante 14-24 hrs.

### 5.0 PRUEBAS SELECTIVAS PARA *Salmonella sp.*

Si presenta crecimiento en cualquiera de los medios de enriquecimiento.

 Tomar una asada y aislar por estria cruzada en los siguientes medios:

- ▶ Agar Verde Brillante
- ▶ Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato
- ▶ Agar Sulfito de Bismuto.

Observar la morfología colonial y microscópica y compararla con la descrita en la tabla No. 4.

Nota: Si al microscopio se observan bacilos gram negativos y su morfología colonial corresponde a *Salmonella sp.*, sembrar por estria y picadura en el medio Agar Triple Azúcar-Hierro e incubar y compararlas con la tabla No. 5 (ver VIII. Anexos)

### 6.0 PRUEBAS SELECTIVAS PARA *Escherichia coli.*

Apartir del crecimiento y si ninguna colonia corresponde a la descrita en la tabla No.5 La muestra cumple con el requisito de ausencia de *Escherichia coli.* Puede ser confirmada utilizando las pruebas bioquímicas correspondientes.

## VII. BIBLIOGRAFÍA:

- 1.0 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004 Tomo 1 y 2

## VIII. ANEXOS

## Anexo 1

Tabla No.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MICROORGANISMOS

MICROORGANISMO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>
MEDIO SELECCIONADO	Agar Vogel-johnson	Agar Cetrimida	Agar MacConkey	Agar Verde Brillante
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS	Negra, rodeada de una zona amarilla	Generalmente verdosas con fluorescencia	Rojo ladrillo, puede estar rodeada de una zona precipitada de bilis	Incolora con zonas rosas transparentes u opacas
TINCIÓN DE GRAM	Cocos positivos	Bacilos negativos	Bacilos negativos	Bacilos negativos

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004

Tabla No. 2 CARACTERÍSTICAS DE *Staphylococcus aureus*.

MEDIOS DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	TINCIÓN DE GRAM
AGAR DE VOGEL- JOHNSON	Colonias negras rodeadas de una zona amarilla	Cocos positivos en racimos
AGAR SAL Y MANITOL	Colonias amarillas rodeada de una zona amarillenta	Cocos positivos en racimos
AGAR BAIRD PARKER	Colonias negras lustrosas rodeadas de zonas claras	Cocos positivos en racimos

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004

Tabla No. 3 CARACTERÍSTICAS COLONIALES de *Pseudomonas aeruginosa*

MEDIOS DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	TINCIÓN DE GRAM	PRUEBA DE OXIDASA
Agar cetrimida	Colonias verdes azulosas, con luz ultravioleta se observan de color verdoso	Bacilos negativos	Positiva
Agar pseudomonas para obtencion de fluorescencia	Colonias incoloras o amarillentas, con luz ultravioleta se observan de color amarillo	Bacilos negativos	Positiva
Agar pseudomonas para obtencion de piocina	Colonia verde-azulosa, con luz ultravioleta se observan de color azul	Bacilos negativos	Positiva

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004

## Anexo 2

**Tabla No. 4** CARACTERÍSTICAS COLONIALES de *Salmonella sp.*

MEDIOS DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	TINCIÓN DE GRAM
Agar Verde Brillante	Colonias pequeñas transparentes, incoloras, rosas o blancas opacas frecuentemente rodeadas	Bacilos negativos
Agar Xilosa-Lisina-Desoxilicato	Colonias con o sin centro negro	Bacilos negativos
Agar Sulfito Bismuto	Colonias negras o verdes	Bacilos negativos

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004

**Tabla No. 5** CARACTERÍSTICAS COLONIALES de *Escherichia coli.*

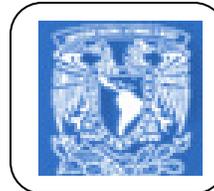
MEDIOS DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	TINCIÓN DE GRAM
Agar MacConkey	Colonias grandes rojas que pueden estar rodeadas de una zona de precipitación de bilis	Bacilos negativos
Agar Levine-Eosina Azul de metileno	Colonias pequeñas azul negro en la parte central con brillo metálico verdoso	Bacilos negativos

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004

ELABORÓ	REVISÓ	APROBO
X. Mozo 12OCT07	L. Acevedo 17OCT07	D. Guzmán 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
11OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
11NOV09

FECHA EFECTIVA  
11NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-12-01

### PROCEDIMIENTO PARA LA TINCION DE GRAM

#### VIII OBJETIVO:

Realizar el método de tinción de gram para la identificación de microorganismos.

#### VIII DEFINICIONES:

**Tinción de Gram.:** Esta técnica de tinción se utiliza para diferenciar y hacer visible la forma celular así como dar contraste entre las diferentes bacterias involucradas, esto se debe a que los colorantes se combinan químicamente con los componentes de la pared celular.

#### VIII ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de microbiología

#### VIII RESPONSABILIDADES:

Del químico analista del área de microbiología

De la jefatura verificar la correcta y completa capacitación de este procedimiento.

#### VIII MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Mechero
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio

- Pinzas
- Asas bacteriológicas
- Solución de cristal violeta
- Solución de safranina
- Lugol
- Alcohol acetona
- Aceite de inmersión

## **VIII PROCEDIMIENTO:**

### **1.0 TINCIÓN DE GRAM**

- ❖ Preparar un frotis con microorganismos provenientes de un cultivo de 24-48 horas de incubación. Si el material de partida es en medio líquido basta con colocar y extender una muestra de la suspensión bacteriana sobre el portaobjetos
- ❖ Aplicar calor suave al portaobjetos con la llama de un mechero o de una lámpara de alcohol de manera paulatina. El calentamiento no debe ser excesivo ni violento.
- ❖ Enfriar y aplicar sobre el frotis unas gotas de solución de cristal violeta, dejar actuar un minuto.
- ❖ Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
- ❖ Aplicar unas gotas de la solución yodo-yodurada (lugol) dejar actuar un minuto.
- ❖ Decantar el lugol perfectamente.
- ❖ Decolorar el frotis con unas gotas de la solución alcohol-acetona, durante no más de 10 segundos.
- ❖ Lavar con agua y escurrir. Aplicar unas gotas de la solución de safranina, dejar actuar entre 15 y 30 segundos.
- ❖ Lavar con agua, inclinar el portaobjeto para dejar escurrir el exceso de agua y secar los bordes con papel secante.

Interpretación de resultados:

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Las bacterias Gram positivas, se observan teñidas de color azul violáceo intenso.

Las Gram negativas se observan de color rojo.

La morfología se identificara como cocos cocobacilos y bacilos

**VIII BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.0 Manual Practico de Microbiología. Diaz Ramón, Et al., 1999., 2ª Ed., Masson 31-47, 155-162p.
- 2.0 <http://www.joseacortes.com/practicas/index.htm>

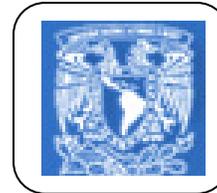
**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 12OCT07	L. Acevedo 17OCT07	D. Guzmán 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
12OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
12NOV09

FECHA EFECTIVA  
12NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-13-01

### PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE ESPORAS

#### I. OBJETIVO:

Realizar la técnica de tinción de esporas para la identificación de microorganismos.

#### II. DEFINICIONES:

**Tinción de esporas:** La bacteria es una estructura muy pequeña, sin embargo, por medio de esta tinción podemos observar la estructura interna de la célula bacteriana, particularmente las endosporas. Algunos géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, producen en su interior endosporas

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicable al área de microbiología.

#### IV. RESPONSABILIDADES:

Del químico analista del área de microbiología seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar la correcta y completa capacitación de este procedimiento.

**V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

- Mechero
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio
- Pinzas
- Asas bacteriológicas
- Papel filtro
- Aceite de inmersión
- Solución de verde de Malaquita
- Solución de safranina

**VI. PROCEDIMIENTO:****1.0 TINCIÓN DE ESPORAS (TECNICA WIRTZ- CONKLIN)**

- 1.1 Preparar un frotis con microorganismos provenientes de un cultivo de 24-48 horas de incubación. Si el material de partida es en medio líquido basta con colocar y extender una muestra de la suspensión bacteriana sobre el portaobjetos.
- 1.2 Teñir con verde malaquita, con unas pinzas de madera colocar la muestra encima de la llama del mechero para que el colorante humee, pero sin que hierva, durante 5 min. Se deberá añadir más colorante si la muestra se seca.
- 1.3 Lavar con agua el resto de colorante.
- 1.4 Se deberá teñir con safranina 1 min.
- 1.5 Lavar con agua el resto de colorante.
- 1.6 Se deberá secar la preparación.
- 1.7 Observar la preparación al microscopio.

Interpretación de resultados

Endosporas esféricas con localización terminal y deformante (palillo de tambor)

Endospora elipsoidal en el centro de la célula vegetativa.

Endospora cilíndrica subterminal no deformante.

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

- a. Manual Practico de Microbiología. Díaz Ramón, Et al., 1999., 2ª Ed., Masson 31-47, 155-162p.
- b. <http://www.joseacortes.com/practicas/index.htm>

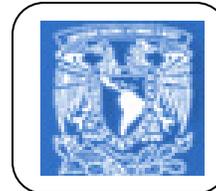
**VIII. ANEXOS**

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 12OCT07	L. Acevedo 17OCT07	D. Guzmán 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
01OCT 07

FECHA VENCIMIENTO  
12NOV09

FECHA EFECTIVA  
12NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-14-01

### PROCEDIMIENTO PARA EL LIMITE MICROBIANO DE MATERIA PRIMA Y PRODUCTOS

#### I. OBJETIVO:

Evaluar la calidad sanitaria de productos farmacéuticos mediante el recuento de microorganismos mesofilos aerobios, hongos filamentosos y levaduras

#### II. DEFINICIONES:

N/A

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al departamento de control microbiológico.

#### IV. RESPONSABILIDADES:

De los químicos analistas de microbiología seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar la correcta y completa capacitación de este procedimiento.

**V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

- Cajas petri desechables esteriles
- Pipetas graduadas
- Balanza
- Machero
- Frascos
- Asa bacteriológica
- Perilla
- Solución salina
- Solución reguladora de fosfatos
- Agar Soya Trypticaseína
- Agar Dextrosa Sabouraud
- Agar Vogel Johnson
- Agar Cetrimida
- Caldo Lactosado
- Caldo Selenito Cisteina
- Caldo Tetrionato
- Agrar Verde Brillante
- Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato
- Agar Sulfito Bismuto
- Agar MacConkey
- Agar Eosina Azul de Metileno

**VI. PROCEDIMIENTO:****1.0 PREPARACION DE MUESTRAS:**

- Sólidos y líquidos miscibles en agua

Se pesan o miden exactamente 10 g o 10 ml de la muestra y se transfieren a 90 ml del diluyente seleccionado.

- Sólidos insolubles

Se pulveriza la cantidad necesaria de muestra para obtener 10 g y se transfieren a 90 ml del diluyente seleccionado.

○ Líquidos no miscibles en agua

Medir exactamente 10 ml del producto, transferirlo a 90 ml del diluyente seleccionado, adicionandole polisorbato 20.

○ Ungüentos y ceras

En un vaso de precipitado esteril, pesar 10 g de la muestra, agregar la cantidad minima necesaria de polisorbato 20 para que al agitar con una barra magnetica esteril se forme una pasta, calentar en baño de agua a una temperatura no mayor de 45° C y agregar gradualmente el volumen necesario para completa 90 ml con el diluyente adecuado.

○ Líquidos viscosas

Para muestras viscosas que no puedan medirse con pipetas se efectuan diluciones de 1:100 1:500.

- Posteriormente se toman 10 ml y se transfieren a 90ml de buffer para tener una dilución 1:100
- De esta se toma 1 ml y se transfieren a un tubo que contiene 9 ml de buffer de fosfatos o solución salina esteril para tener una dilución 1:1000.
- Se inoculan por duplicado 1 ml de cada dilución del producto en cajas petri esteriles previamente rotuladas con fecha, clave del medio, lote del producto y dilución.
- Añadir a cada caja de 15-20 ml de medio agar soya tripticaseina o agar dextrosa sabouraud según sea el caso, manteniendo a una temperatura de 45-50° C. Realizar de cada medio un testigo positivo y untestigo negativo.
- Dejar solidificar el medio e incubarlo a una temperatura de 22-25°C para TSA y de 48 a 72 horas de 5 a 7 días para SDA (agar dextrosa sabouraud).

## 2.0 PATOGENOS

La primera dilución se incuba a 35+/-2°C por 24 horas.

Transcurrido este tiempo se hace la investigación de microorganismos objetables.

➤ ***Pseudomona aeruginosa:***

Tomar una asada del cultivo anterior y sembrar por estria en agar cetrimida.

➤ ***Staphylococcus aureus:***

Tomar una asada del cultivo anterior y sembrar por Estria en Agar Sal y Manitol o en Agar Vogel Johnson.

- **Salmonella y Escherichia coli:** Inocular de la primera dilución 1 ml a los siguientes medios; en 10 ml de Caldo Selenito Cisteína, 10 ml de medio Caldo Tetrionato.
  - ▶ Mezclar e incubar de 18 a 24 horas.
  - ▶ Para **Salmonella** tomar una asada de cada uno de los medios y resembrar por estria cruzada en los medios; Agar Verde Brillante, Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato.
  - ▶ Aislamiento de **Escherichia coli:** a partir del medio Caldo Lactosado, aislar resembrando por estria cruzada en Agar Eosina Azul de Metileno y Agar MacConkey.

Observar la morfología microscopica colonial y compararla con las descritas en la siguiente tabla 6. (ver anexo 1)

#### Resultados

Después del periodo de incubación contar el número de UFC, determinar las UFC de la placa 1 y de la placa 2, calcular el promedio con la siguiente ecuación:

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

Anotar el promedio de colonias por dilución, reportando las UFC por g ó ml del producto, considerando el factor de dilución de la muestra.

#### c. TRATAMIENTO DE ANALISIS DE MATERIAS PRIMAS; PRODUCTO EN PROCESO Y PRODUCTO TERMINADO.

- ▶ Pesar 10 g de la muestra y disolver en Buffer de fosfatos pH=7.2 (Dilución 1:10)
- ▶ De esta primera dilución se toman 5 ml y se transfieren a un tubo conteniendo 5 ml de fosfatos de pH=7.2 (Dilución 1:20)
- ▶ De ésta última dilución se toma 1 ml y se inocula por duplicado en cajas petri para medio de SDA.
- ▶ De la dilución 1:10 transferir 10 ml a un frasco conteniendo 90 ml de Buffer de Fosfatos (Dilución 1:100) y adicionar 5 ml de Penicilasa e incubar por 30 minutos a una temperatura de 30-32°C.
- ▶ Posterior al tiempo de incubación se toma 1 ml y se inocula por duplicado a cajas petri para medio de TSA (dilución 1:100).
- ▶ De la dilución 1:100 transferir 1 ml a un tubo que contenga 9 ml de Buffer de fosfatos pH = 7.2 ( Dilución (1:1000) y se inocula 1 ml por duplicado a cajas de petri para medio TSA (agar soya tripticaseina).

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.0 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de Medicamentos. PROY-NOM-059-SSA1-2003
- 2.0 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004 Tomo 1 y 2

**VIII. ANEXOS**

## Anexo 1

**Tabla No. 6 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCOPICA
Agar Vogel-Johnson	Colonias negras rodeadas de una zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Agar Sal y Manitol	Colonias amarillas rodeadas de una zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Agar Cetrimida	Colonias verde azulosas con Luz U.V. se observan verdoso fluorescentes	Bacilos Gram negativos
Agar Verde Brillante	Colonias pequeñas transparentes, incoloras rosadas o blancas opacas rodeadas por una zona roja o rosa	Bacilos Gram negativos
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias que no modifican el medio, rojas con o sin centro negro	Bacilos Gram negativos
Agar MacConkey	Colonias grandes rosas-rojas rodeadas de una zona de precipitación	Bacilos Gram negativos
Agar Eosina Azul de Metileno	Colonias pequeñas azul-negro con brillo metálico verde	Bacilos Gram negativos

Fuente: Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de Medicamentos

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
<b>X. Mozo</b> 12OCT07	<b>L. Acevedo</b> 17OCT07	<b>D. Guzmán</b> 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
15OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
15NOV09

FECHA EFECTIVA  
15NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-15-01

## PROCEDIMIENTO DE CONTROL AMBIENTAL

### I. OBJETIVO:

Establecer los pasos a seguir para realizar la evaluación microbiologica ambiental de las diferentes áreas de un laboratorio.

### II. DEFINICIONES:

N/A

### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica a todas las áreas productivas, almacenes y departamentos de análisis.

### IV. RESPONSABILIDAD:

De los químicos analistas del departamento de control de calidad, seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar la correcta y completa capacitación de este procedimiento.

### V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Agar Soya Trypticaseína
- Cajas de petri desechables
- Agua de osmosis inversa
- Penicilinas (según sea el área)

- Agar Dextrosa Sabouraud
- Incubadoras
- Jeringas
- Hipoclorito de sodio
- Cilindro de acero inoxidable

## VI. PROCEDIMIENTO:

### 1.0 EXPOSICIÓN POR PLACA

- ▶ Preparar los medios TSA (Agar soya tripticaseina) y SDA (Agar dextrosa sabouraud)
- ▶ Se rotulan las cajas adecuadamente: medio, fecha y clave del punto a monitorear.
- ▶ Colocar las cajas dentro de un cilindro de acero inoxidable previamente sanitizado
- ▶ Traslarse al área de muestreo y colocar las cajas en los diferentes puntos críticos, establecidos como las mesas de trabajo, cada esquina del área de trabajo, al lado de un equipo o máquina, etc. señalados y exponer las placas durante 30 minutos
- ▶ Transcurrido el tiempo de exposición recolectar las cajas y llevarlas al laboratorio de microbiología para su incubación, a una temperatura de 35+/-2°C para TSA y 22-25°C para SDA por tiempos de 48 horas y de 5-7 días respectivamente.

### 2.0 MONITOREO DE SUPERFICIES

- ▶ Se transfieren 10 ml de solución salina a tubos de ensayo y se les colocan isopos, se tapan y se esterilizan de forma adecuada. Los tubos necesarios para el monitoreo deben estar adecuadamente rotulados
- ▶ Traslarse al área de muestreo, se toma el isopo, abarcando una zona de 25 cm en movimiento de zig-zag, de izquierda a derecha de arriba hacia abajo.
- ▶ Finalizando el muestreo se lleva al área de microbiología para su análisis posterior
- ▶ Los tubos son agitados en vortex antes de vaciar a las cajas, las cuales se rotulan adecuadamente se vacía 1 ml de SAD como TSA.
- ▶ Vaciar entre 15 y 20 ml de medio
- ▶ Solidificado el medio las cajas incubar a las condiciones adecuadas de TSA y SDA.

**Nota:** Los límites indican no más de 100 UFC/placa.

Resultados:

Si la cuenta de microorganismos viables este fuera de especificaciones se deberá realizar una desviación al área, firmada por el supervisor del área de microbiología y el gerente de control de calidad.

### 3.0 EXPOSICION POR KITS

Quick Swab™ de 3M o Placas Petrifilm<sup>(MR)</sup>

Son métodos disponibles para hisopado y exposición de placas ambientales más eficientes, rentables y económicos en el mercado.

#### Monitoreo Ambiental

- Hidratar las Placas Petrifilm<sup>(MR)</sup>
- Exponerlas al medio ambiente hasta 15 minutos
- Incubar e interpretar resultados

#### Monitoreo de Superficies

- Muestrear la superficie
- Inocular placas
- Incubar e interpretar resultados

Las Placas Petrifilm<sup>(MR)</sup> pueden hidratarse y ponerse en contacto directo con superficies vivas o inertes.

## VII. BIBLIOGRAFÍA:

- 1.0 Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección general de Insumos para la salud, S.S.A., 1990.
- 2.0 NOM-059-SSA1-1993 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de Medicamentos.

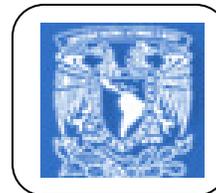
## VIII. ANEXOS

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 12OCT07	L. Acevedo 17OCT07	D. Guzmán 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
21OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
21NOV09

FECHA EFECTIVA  
21NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-16-01

### PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA DEL PERSONAL

#### I. OBJETIVO:

Llevar a cabo el muestreo de los operadores que intervienen en la fabricación de los medicamentos, por medio de isopado en manos y ropa para evaluar los niveles de contenido microbiano del operario

#### II. DEFINICIONES:

N/A

#### III. ALCANCE:

Aplica para el personal de Microbiología y personal involucrado en la fabricación de medicamentos.

#### IV. RESPONSABILIDAD:

Es responsabilidad del personal técnico y Químico de microbiología conocer y aplicar correctamente este procedimiento.

Es responsabilidad del supervisor de microbiología y del jefe verificar que se lleve a cabo y de forma correcta el presente procedimiento normalizado de operación.

**V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

- Agar soya tripticaseina (AST)
- Agar dextrosa sabouraud (ADS)
- Matraz erlenmeyer 1000mL
- Agua desmineralizada
- Autoclave
- Placas Rodac de AST y ADS
- Guantes estériles
- Piseta con etanol al 70%
- Contador de colonias
- Incubadora de 35°C +/- 2°C
- Incubadora para 25 °C +/- 2 °C
- Hisopos
- Tubos con Buffer
- Plumón especial para áreas asépticas

**VI. PROCEDIMIENTO:**

- ❖ Ver la posición para el monitoreo de personal indicado en la tabla 1 (ver anexo)
- ❖ Coloque el rodac con el rotulo hacia abajo sobre la charola.
- ❖ Separe cuidadosamente la base del rodac que contiene el agar
- ❖ Tome la placa con ayuda de su dedo índice y pulgar y colóquelas sobre la superficie a monitorear, no debe ejercer demasiada presión o rotar la placa sobre el uniforme del personal
- ❖ Una vez realizado el monitoreo coloque sus placas en la charola donde las transporte y llévelas al área de microbiología.
- ❖ Incube las placas de agar soya tripticaseina a una temperatura de 37+/- 2°C durante 72 horas y las placas de agar destroxa sabouraud a una temperatura de 25+/- 2°C durante 5 días.
- ❖ Durante el periodo de incubación revise las placas diariamente, utilizando el contador de colonias
- ❖ Una vez finalizado el periodo de intubación, los resultados obtenidos se reportan en el cuaderno de registro correspondiente y formato correspondiente.

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.0 Directrices sobre buenas practicas para la fabricación de productos farmacéuticos.
- 2.0 Ramírez, J. Violeta, 2006. Elaboración de procedimientos normalizados de operación requeridos para el control microbiológico de medicamentos estériles, informe de trabajo profesional para obtener el titulo de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de estudios Superiores Cuautitlan.

## VIII. ANEXOS

## Anexo 1

Tabla 1. Posición para el monitoreo del personal

NO DE POSICION	UBICACION	ESPECIFICACIONES
1	Guantes	Bacterias 1 UFC/5cm <sup>2</sup>  Ausencia de Hongos
2	Puños	
3	Antebrazos	
4	Cuello	
5	Pecho	
6	Vientre	
7	Muslos	
8	Rodillas	
9	tobillos	

Fuente: Informe de trabajo profesional que para obtener el título de Química farmacéutica bióloga presenta Ramírez, J. Violeta:2006

ELABORÓ	REVISÓ	APROBO
<b>X. Mozo</b> 12OCT07	<b>L. Acevedo</b> 17OCT07	<b>D. Guzmán</b> 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
29OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
22NOV09

FECHA EFECTIVA  
22NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-17-01

### PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DEL AIRE FILTRADO

#### I. OBJETIVO:

Verificar la eficacia del aire filtrado utilizado en las áreas de fabricación, con el fin de garantizar que este libre de microorganismos y/o partículas extrañas.

#### II. DEFINICIONES:

N/A

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento aplica al área de control microbiológico.

#### IV. RESPONSABILIDADES:

De los químicos analistas de microbiología, seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar la correcta y completa capacitación de este procedimiento.

#### V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Matraces Erlenmeyer
- Mangueras de tygon
- Guantes de cirujano
- Autoclave

- Mechero
- Pipetas graduadas
- Perilla de hule
- Solución salina isotónica esteril
- Agar de Soya Trypticaseína esteril
- Agua peptonada al 1 % esteril
- Buffer de fosfatos esteril

#### VI. PROCEDIMIENTO:

- 📖 Deberá de tomar la muestra con guantes , matraz y mangera esteril.
- 📖 Colocar la mangera dentro del matraz que ya contiene buffer de fosfatos o solución isotónica esteril.
- 📖 Dejar burbujear dentro de la solución por un tiempo aproximado de 3 minutos
- 📖 Cerrar el matraz y llevarlo al area para su analisis
- 📖 Filtrar la muestra y sembrar la membrana en AST e incubar a 37°C durante 48 Horas
- 📖 Realizar la lectura de las placas.

**Nota:** Si la cuenta microbiana se acerca a los límites de 500 UFC/100 ml se envía una boleta para hacer el cambio de filtros.

#### VII. BIBLIOGRAFÍA:

- 1.0 Calibration and testing Laboratories. ISO 9000-ISO 17025

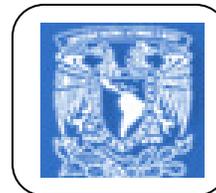
#### VIII. ANEXOS

N/A

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
X. Mozo 12OCT07	L. Acevedo 17OCT07	D. Guzmán 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MICROBIOLOGIA



FOLIO DE DC  
(Documento de cambios)  
N/A

FECHA DE REVISION  
30OCT07

FECHA VENCIMIENTO  
23NOV09

FECHA EFECTIVA  
23NOV07

CODIGO Y VERSION  
PNO-CCM-18-01

### PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO Y ANALISIS MICROBIOLOGICO DE AGUAS

#### I. OBJETIVO:

Establecer los pasos a seguir para llevar a cabo el muestreo y analisis microbiológico de aguas.

#### II. DEFINICIONES:

**Técnica del número más probable:** Esta técnica se basa en la inoculación de la muestra diluida y sin diluir, en un medio liquido que contenga lactosa.

**Numero más probable (NMP):** Expresión estadística que se utiliza para estimar la cantidad de bacterias conformes presentes en un volumen de muestra determinado.

#### III. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicable al área de control de calidad y de producción.

#### IV. RESPONSABILIDAD:

De los químicos analistas del departamento de control de calidad, seguir todos y cada uno de los pasos de este procedimiento.

De la jefatura verificar la correcta y completa capacitación de este procedimiento.

**V. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:**

- Guantes para cirujano
- Jeringas esteriles o frascos previamente esterilizados
- Etiquetas
- Equipo de filtración esteril
- Membranas esteriles
- Bomba de vacio
- Placas de agar soya tripticaseína o de Agar Metodos Estandar
- Pinzas esteriles
- Tubos con Caldo Lactosado Con Purpura de Bromocresol y con Campana Durham.
- Pipetas esteriles
- Estufa
- Placas con agar cetrimida
- Gradilla
- Agua utilizada en la elaboración de un producto
- Mechero

**VI. PROCEDIMIENTO:****1.0 TOMA DE MUESTRA DE AGUA**

- ❖ El químico analista del área de microbiología debera recibir por parte de supervisor correspondiente la boleta donde solicita el análisis. En ella se indica:
  - Producto a fabricar
  - Tipo de agua
  - Firma del supervisor en turno
- ❖ Se verificaran los datos de la boleta y se procede a elaborar la etiqueta, la cual contiene: producto, lote, fecha y firma de quien realiza el muestreo.
- ❖ Realizar el muestreo de forma adecuada según sea el caso ( ya que puede ser agua desionizada de columna, entrada o salida de equipos, para lavado de ampollitas, para la fabricación de inyectables, agua de marmita, agua de filtros, agua de cisternas, agua de osmosis inversa, etc.).
- ❖ Se revisa la cantidad de agua en existencia se verifican las tuberias o tanques.
- ❖ Sanitizar con alcohol la toma de agua.
- ❖ Abrir la llave y dejar correr el agua por un tiempo no menor de 2 minutos, hacer la toma de muestra.

## 2.0 CUENTA TOTAL MICROBIANA

### METODO DE VACIADO EN PLACA

- A partir de la muestra se realizan diluciones de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  con solución salina.
- De cada dilución se transfiere 1 ml para dos cajas esteriles vacias previamente identificadas.
- Se vierte el medio, aproximadamente 20 ml.
- Ya solidificado el agar incubar las cajas de TSA en condiciones de temperatura y tiempos adecuados (ver anexo 1 de éste manual)

Para el caso de agua potable antes de las diluciones agregar 0.1 ml de Tiosulfito de sodio esteril al 10 % por cada 100 ml de muestra para desactivar.

### METODO DE MEMBRANAS FILTRANTES

- Preparar el equipo de filtración previamente esterilizado
- Filtrar 100 ml de la muestra de agua mediante vacío
- Retirar la membrana del filtro con ayuda de una pinzas esteriles.
- Colocarla en la superficie de una placa de TSA o AME
- Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por un tiempo de 48 a 72 horas

## 3.0 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES

### TECNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE O TÉCNICA EN TUBO

#### *Prueba presuntiva*

- Mezclar vigorosamente la muestra, agitandolo para lograr una distribución uniforme de los microorganismos
- Utilizar como medio caldo lactosado con púrpura de bromocresol en tubos de 10 ml del medio; de la siguiente manera:
  - ▶ Tres tubos con medio de cultivo de doble concentración (10ml)
  - ▶ Seis tubos con medio de cultivo de concentración sencilla (20ml)
    - Añadir con pipetas esteriles 10ml de la muestra en los tubos con caldo lactosado de doble concentración
    - Añadir con pipetas esteriles 1ml de la muestra en los tubos con caldo lactosado de concentración sencilla.
    - Añadir con pipetas esteriles 0.1ml de la muestra en los tubos con caldo lactosado de concentración sencilla.
    - Incubar los tubos a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por un tiempo de 24 horas y observar la formación de gas, si no se observa incubar 24 horas mas.

*Prueba confirmativa*

- De los tubos que tengan formación de gas, tomar una asada y sembrar en un numero igual de tubos con caldo bilis lactosa verde brillante.
- Incubar por 24 horas.
- Si la formación de gas no se observa en este tiempo incubar 24 horas más.
- Una vez concluido el tiempo de incubación la formación de gas se dara como positiva la prueba.

DETERMINACIÓN DE PSEUDOMONAS

- Filtrar en condiciones asepticas 100 ml de la muestra a traves de membranas esteriles de 0.45 micras y 47 mm.
- Retilas la membrana con pinzas esterilies
- Colocarla sobre una caja de agar Cetrimida e incubar por 48 horas.

## Resultados:

Ver la tabla No.7 de tipos de agua y sus limites microbianos, mostrados en el anexo 1

Para la cuenta total de mesofilos aerobios, se reportara de la siguiente manera:

- Para agua potable, el promedio de las dos cajas por el factor de dilución, reportando en UFC/ml.
- Para la prueba de Pseudomonas se observa si hay presencia o no de las colonias amarillo-verdosas que dan fluorescencia a la luz U.V. si se observan hacer una resiembra en Agar Cetrimida se incuba por 24 horas, en caso de no presentar dichas colonias la prueba se da como negativa y se reporta como ausentes.

Para coliformes totales, se reporta según los resultados obtenidos y la tabla 8 (ver anexos)

**VII. BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.0 Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección general de Insumos para la salud, S.S.A., 1990.
- 2.0 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004 Tomo 1 y 2

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1

**Tabla No. 7** Tipos de agua y límites microbianos

<b>TIPO</b>	<b>CUENTA TOTAL</b>	<b><i>PSEUDOMONAS</i></b>	<b>COLIFORMES TOTALES</b>	<b>ENDOTOXINAS</b>
Potable	100-200 UFC/ml	Ausentes	No mas de 2 NMP/100 ml	NA
Desionizada	No mas de 100 UFC/100 ml	Ausentes	No mas de 2 NMP/100 ml	NA
Purificada	No mas de 100 UFC/ml	Ausentes	No mas de 2 NMP/100 ml	NA
P. inyectables	No mas de 10 UFC/100 ml	Ausentes	No mas de 2 NMP/100 ml	No mas de 0.25 UE/ml

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004 Tomo 1 y 2

**Anexo 2****Tabla. 8** Numero mas probable de microorganismos (NMP)

3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0.1 ml	NMP
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	mas de 2400

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2006 Primer suplemento

ELABORÓ	REVISÓ	APROBO
<b>X. Mozo</b> 12OCT07	<b>L. Acevedo</b> 17OCT07	<b>D. Guzmán</b> 03NOV07
FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA	FIRMA Y FECHA

COPIA CONTROLADA PROPIEDAD DE LA EMPRESA

## **CONCLUSIONES**

#### **XIV. CONCLUSIONES**

Puedo concluir que logre el objetivo principal de éste trabajo, es decir logre desarrollar éste Manual de Procedimientos Normalizados de Operación Básicos de Control de Calidad Microbiológico en la Industria Farmacéutica, en donde realicé una búsqueda sobre las normas nacionales e internacionales más importantes que deben aplicarse en la industria farmacéutica y más aún en el laboratorio de control de calidad microbiológico.

Como primer punto pude realizar una investigación sobre los puntos más importantes que nos menciona la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA-1-1993, las buenas prácticas de documentación (BPD), las buenas prácticas de Manufactura (BPM), las especificaciones farmacopeicas y las normas ISO 9000, que nos impactan al momento de realizar procedimientos normalizados de operación, de esta forma llegue a la definición de calidad, el control de calidad, la gestión de la calidad, las características del personal, las condiciones, el manejo de reactivos, de medios de cultivo, las instalaciones, los laboratorios, los controles, los registros, las responsabilidades, etc que deben ser implementados en la industria farmacéutica.

Como segundo punto logre desarrollar un procedimiento normalizado de operación para realizar procedimientos investigando para ello cuales son los puntos básicos y esenciales al momento de realizar procedimientos en el laboratorio de microbiología, como son; el objetivo, el alcance, las responsabilidades, el desarrollo del proceso o procedimiento, y la bibliografía, algunos otros no menos importantes pero que tan bien pueden ayudar mucho a comprender y detallar mas las actividades como son; las definiciones, los materiales, los reactivos y los anexos.

Como tercer punto realice una investigación bibliográfica sobre algunas técnicas y métodos empleados en microbiología, como son: el vestido y desvestido del área estéril, la utilización y limpieza en hornos, incubadoras, autoclaves, la preparación de reactivos, de medios de cultivo, de soluciones, las técnicas de sembrado por dilución, técnica vaciado en placa, técnica del numero mas probable, la promoción de crecimiento, la identificación de microorganismos, las técnicas de tinción mas usuales como son; la tinción de Gram, tinción de esporas, los limites microbianos, el control ambiental, la toma de muestras del personal de los laboratorios, de las áreas de producción, procedimiento para muestreo de aire, análisis de aguas, las técnicas para la identificación de microorganismos, la prueba de oxidasa, de coagulasa, las identificaciones morfológicas, monitoreos ambientales, la identificación de microorganismos mas frecuentes o patógenos en los medicamentos, los monitoreos ambientales, así mismo se menciona la identificación de microorganismos por medios comerciales, las pruebas API, entre otros.

Finalmente logre combinar la informacion recopilada de microbiologia y la parte de legislacion farmaceutica, es decir pude realizar algunos de los procedimientos normalizados de operación mas usuales en el laboratorio de control de calidad microbiológico considerando la investigacion de las bases importantes de microbiología, los métodos, técnicas empleados y la información sobre las leyes, reglamentos, normas internacionales y mexicanas.

Por ultimo espero lograr la principal funcion de éste trabajo, ya que es para tí, estudiante, compañero y colega, que quieres emprender hacia el laboratorio de microbiología, ya que es un campo muy interesante, esencial e importante en la industria farmacéutica, pretendo darte las bases del resto que tú quieras implementar. Tambien considero que nosotros somos parte importante en los todos los seres humanos que requieren de esos medicamentos que nosotros mismos como Químicos Farmacéuticos Biólogos, imaginamos, estudiamos, desarrollamos, fabricamos y distribuimos para la mejora continua de la salud.

## **ANEXOS**

**XV. ANEXOS****Anexo I****REACTIVOS, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.**

A continuación se mencionan los reactivos, soluciones y medios de cultivo empleados, los reactivos empleados en estas pruebas deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa.

**A. REACTIVOS:**

Aceite mineral  
Acetona  
Acido acético  
Acido clorhídrico  
Acido oxálico  
Acido sulfanílico  
Acido tartárico  
Alcohol amílico o butílico  
Alfa naftilamino  
Amoniac concentrado  
Cloruro de sodio  
Cristal violeta  
Diclorhidrato de N-N-dimetil p-fenilendiamina  
Etanol absoluto  
Fosfato monobásico de potasio  
Hidróxido de potasio  
Hidróxido de sodio al 10%  
1-Naftol  
Oxalato de amonio  
Para dimetilamino benzaldehído  
Peróxido de hidrógeno  
Plasma de conejo o cobayo  
Rojo de metilo  
Safranina O  
Sulfato de cobre  
Telurito de potasio  
Tween 80  
Yodo o Yoduro de potasio  
Zinc en polvo

## B. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Cetrimida  
 Agar Citrato de Simmons  
 Agar DNA azul-toluidina  
 Agar Eosina azul de metileno  
 Agar Extracto de malta  
 Agar Hierro y Lisina  
 Agar Hierro y triple azúcar  
 Agar Letthen modificado  
 Agar MacConkey  
 Agar Pseudomona F o Pseudomona P  
 Agar Papa Dextrosa  
 Agar Sal-Manitol  
 Agar Sulfito de bismuto  
 Agar Verde Brillante  
 Agar Vogel-Johnson  
 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (agar XLD)  
 Base de Caldo Tetracionato  
 Caldo Cistina Selenito  
 Caldo Dextrosa Sabouraud  
 Caldo Infusión de Cerebro Corazón  
 Caldo Letthen modificado  
 Caldo Lisina Descarboxilasa  
 Caldo Urea  
 Medio basal O/F (oxidativo-fermentativo)  
 Medio Indol Ornitina  
 Medio Indol Nitrito  
 Medio rojo de metilo Voges Proskauer  
 Medio SIM  
 Tiras API para pruebas bioquímicas

### 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### Solución salina al 0,85%

Cloruro de sodio	8,5 g
Agua c.b.p.	1 000,0 ml

Disolver el cloruro de sodio en 500 ml de agua, llevar a aforo a 1 000 ml, ajustar el pH a  $7.2 \pm 0.1$  filtrar, envasar y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Solución de etanol 80% y HCl al 1% v/v

Etanol	80.0 ml
HCl	1.0 ml
Agua c.b.p.	100.0 ml

Mezclar el etanol y el HCl, llevar a aforo a 100 ml con agua y envasar.

Solución de tween 80%

Tween 80% sin diluir

Envasar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Aceite mineral

Envasar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solución de Acido Tartárico al 10% p/v

Acido Tartárico	10.0 g
Agua c.b.p.	100.0 ml

Disolver el ácido tartárico en 50 ml de agua, llevar a aforo a 100 ml, envasar y esterilizar por filtración por membrana.

Solución de telurito de potasio al 1% p/v

Telurito de potasio	1.0 g
Agua c.b.p.	100.0 ml

Disolver el telurito en 50 ml de agua, llevar a aforo a 100 ml, envasar y esterilizar por filtración por membrana.

Solución de yodo-yoduro de potasio p/v

Yodo	6.0 g
Yoduro de potasio	5.0 g
Agua	20.0 ml

Disolver el yoduro de potasio en el agua y en esta solución disolver el yodo. Conservar en envases protegidos de la luz.

Solución de agua oxigenada al 3% v/v

Peróxido de Hidrógeno	3.0 ml
Agua c.b.p.	100.0 ml

Mezclar el peróxido en agua, llevar a aforo a 100 ml y envasar.

Solución indicadora rojo de metilo

Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol al 95%	300.0 ml
Agua c.b.p.	500.0 ml

Mezclar el rojo de metilo en el alcohol y diluir con agua a 500 ml.

Reactivo de Griess-Ilosvays

- Solución A

Acido sulfanílico	8.0 g
Acido acético 5N	1 000.0 ml

El ácido acético 5N se prepara agregándole un volumen de ácido acético glacial a 2,5 volúmenes de agua. Mezcle bien, añada luego el ácido sulfanílico y vuelva a mezclar.

- Solución B

Alfa naftilamina	8.0 g
Acido acético 5N	1 000.0 ml

Mezclar y almacenar en refrigeración (4°C) cuando no esté en uso. Generalmente ambos reactivos son estables aproximadamente durante 3 meses.

Reactivo de Kovacs y Ehrlich

Para-dimetil-amino-benzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico o butílico	75.0 ml
Acido clorhídrico (37%) Q.P.	25.0 ml

Disuelva el para-dimetil-amino-benzaldehído en el alcohol. Caliente suavemente la solución en un baño de agua tibia. Una vez disueltos los ingredientes, agregue el ácido clorhídrico con cuidado.

Reactivo de O'Meora

Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua	100.0 ml

Disolver y enfriar. Añadir 0,3 g de creatinina (monohidrato) La solución reactiva, lista para el uso, puede conservarse en refrigeración (+4°C) durante 4 semanas aproximadamente.

Solución de sulfato de cobre según Leifson

Sulfato de cobre	1.0 g
Amoniaco concentrado	40.0 ml
Solución de sosa potásica al 10%	690.0 ml

Disolver el sulfato de cobre con amoniaco concentrado y añadir hidróxido de potasio al 10% que ha sido preparada con hidróxido de potasio.

Reactivo de Barrit

1-naftol A	5.0 g
Alcohol absoluto	100.0 ml

Disolver el 1-naftol en el alcohol y envasar.

Solución de cristal violeta

Cristal violeta	0.010 g
Acido acético glacial	10.0 ml

Disolver el cristal violeta en el ácido acético y envasar.

Solución yodo-yodurada

Yoduro de potasio	2.0 g
Yodo	1.0 g
Agua	100.0 ml

Triturar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio, adicionar el agua necesaria para que se disuelva el yodo, agregar agua hasta un volumen de 100 ml. Conservar protegido de la luz.

Solución safranina

Safranina "O"	2.5 g
Alcohol etílico al 95%	100.0 ml

Disolver la safranina "O" en el alcohol etílico. Tomar 10 ml de esta solución y llevar a 100 ml con agua. Agitar.

Solución alcohol-acetona

Partes iguales de acetona y alcohol etílico al 95%.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1 MEDIOS ENRIQUECIDOS O NUTRITIVOS

#### Agar Lethen modificado

Agar Lethen	32.0 g
Peptona de caseína	5.0 g
Peptona de carne	10.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Bisulfito de sodio	0.1 g
Agar	5.0 g
Agua	1 000.0 ml
pH final después de esterilizar $7.2 \pm 0.2$	

Mezclar los componentes y calentar con agitación hasta la disolución completa del agar. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### Caldo Lethen modificado

Caldo Lethen	26.7 g
Peptona de caseína	5.0 g
Peptona de carne	10.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Bisulfito de sodio	0.1 g
Agua	1 000.0 ml
pH final después de esterilizar $7.2 \pm 0.2$	

Mezclar los componentes hasta la disolución completa y distribuir 95 ml en botellas con tapón de rosca para dilución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### Agar papa dextrosa

Infusión de papa	200.0 ml
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1 000.0 ml
pH final $5.6 \pm 0.2$	

Suspender los ingredientes en un litro de agua agitando, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C

durante 15 minutos. Antes de usarse se licua, se enfría a 45-50°C, se ajusta el pH a 3.5 con una solución de ácido tartárico al 10%.

#### Base de caldo tetrionato

Mezcla de peptonas	5.0 g
Mezcla de sales biliares	1.0 g
Carbonato de calcio	10.0 g
Tiosulfato de sodio	30.0 g
Agua	1 000.0 ml

pH final  $7.0 \pm 0.1$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Mezclar bien y calentar a ebullición. Dejar enfriar y envasar en tubos de ensayo estériles, en volúmenes de 10 ml cada uno.

Guardar en refrigeración. No esterilizar en autoclave. Momentos antes de usarlo agregar 0.2 ml (de 3 a 4 gotas) de la solución yodo-yoduro de potasio (6.3.1.7) a cada tubo. Usar el medio el mismo día en que se le agrega la solución de yodo.

#### Caldo Dextrosa Sabouraud

Polipeptona o neopeptona	10.0 g
Dextrosa	40.0 g
Agua	1 000.0 ml

pH después de esterilizar  $5.6 \pm 0.2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. No sobrecalentar, ya que por su alto contenido en carbohidratos se oscurece y pierde eficacia.

## 2.2 MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.

#### Agar MacConkey

Digerido pancreático de gelatina	17.0 g
Digerido pancreático de caseína	1.5 g
Digerido péptico de tejido animal	1.5 g
Lactosa	10.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g

Cristal Violeta	0.001 g
-----------------	---------

Agua	1 000.0 ml
------	------------

pH después de esterilizar  $7.1 \pm 0.2$

Suspender el medio deshidratado en 1 000 ml de agua, remojar de 10 a 15 minutos y calentar a ebullición agitando continuamente. Hervir durante un minuto, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y vaciar en cajas Petri unos 20 ml por placa. Dejar solidificar y luego invertir las cajas para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

#### Agar Vogel Johnson

Digerido pancreático de caseína	10.0 g
---------------------------------	--------

Extracto de levadura	5.0 g
----------------------	-------

Manitol	10.0 g
---------	--------

Fosfato dibásico de potasio	5.0 g
-----------------------------	-------

Cloruro de litio	5.0 g
------------------	-------

Glicina	10.0 g
---------	--------

Agar	16.0 g
------	--------

Rojo de fenol	0.025 g
---------------	---------

Agua	1 000.0 ml
------	------------

pH después de esterilizar  $7.2 \pm 0.2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, mezclar, dejar remojar de 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar el medio entre 45 y 50°C y adicionar 20 ml de una solución estéril al 1 % de telurito de potasio. Agitar vigorosamente y distribuir unos 20 ml en cajas de Petri.

#### Agar de sal y manitol

Digerido pancreático de caseína	5.0 g
---------------------------------	-------

Digerido péptico de tejido animal	5.0 g
-----------------------------------	-------

Extracto de carne	1.0 g
-------------------	-------

D-manitol	10.0 g
-----------	--------

Cloruro de sodio	75.0 g
------------------	--------

Agar	15.0 g
------	--------

Rojo de fenol	0.025 g
---------------	---------

Agua	1 000.0 ml
------	------------

pH después de esterilizar  $7.4 \pm 0.2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y remojar 15 minutos. Mezclar y calentar a ebullición durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir porciones de 20 ml en cajas Petri de 15x100 mm.

Agar Cetrimida

Digerido pancreático de gelatina	20.0 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato de potasio	10.0 g
Agar	13.6 g
Cetil bromuro de trimetil amonio (cetrimida)	0.3 g
Glicerol	10.0 ml
Agua	1 000.0 ml

pH después de esterilizar  $7.2 \pm 0.2$

Disolver en agua los componentes sólidos antes de adicionar el glicerol. Remojar unos 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Eosina azul de metileno

Digerido pancreático de gelatina	10.0 g
Fosfato dibásico de potasio	2.0 g
Agar	15.0 g
Lactosa	10.0 g
Eosina "Y"	0.4 g
Azul de metileno (Metiltionina)	0.065 g
Agua	1 000.0 ml

pH después de esterilizar  $7.1 \pm 0.2$

Disolver el digerido pancreático de gelatina, el fosfato dibásico de potasio y el agar en el agua. Esterilizar, dejar enfriar y antes de utilizar, agregar las siguientes soluciones a cada 100 ml de agar líquido: 5 ml de solución 1:5 de lactosa, 2 ml de solución 1:50 de eosina "Y" y 2 ml de solución 1:300 de azul de metileno. Mezclar.

Agar Extracto de malta

Extracto de malta	30.0 g
Agar	20.0 g
Agua	1 000.0 ml

pH después de esterilizar  $5.5 \pm 0.2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, homogeneizar y remojar de 10 a 15 minutos, calentar agitando frecuentemente, hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Si el medio se sobrecalienta el agar perderá su capacidad de gelificarse. Enfriar de 47-50°C y ajustar el pH a 3.5 con una solución de ácido tartárico al 10% estéril.

#### Caldo Infusión de Cerebro Corazón

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión de corazón de res	250.0 g
Peptona de gelatina	10.0 g
Dextrosa	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico	2.5 g
Agua	1 000.0 ml

pH final 7.4 ± 0.2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y calentar ligeramente si es necesario. Se puede agregar 0,1% de agar si se desea. Envasar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

#### Agar Verde brillante.

Extracto de levadura	3.0 g
Mezcla de peptonas	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Rojo de fenol	0.08 g
Agar	20.0 g
Verde brillante	0.125 g
Agua	1 000.0 ml

pH final 6.9 ± 0.2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y dejar remojar unos 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 45-50°C y distribuir en cajas de Petri estériles.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (agar XLD)

Xilosa	3.5 g
L-Lisina	5.0 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Rojo de fenol	0.08 g
Agar	13.5 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g
Tiosulfato de sodio	6.8 g
Citrato de hierro y amonio	0.8 g
Agua	1 000.0 ml

pH final  $7.4 \pm 0.2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y dejar que se remoje de 10 a 15 minutos. Calentar con todo cuidado y agitando con frecuencia justamente hasta que el medio hierva. No sobrecalentar. Transfiera al baño de agua, dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri. El medio debe ser transparente y color rojo rubí anaranjado, en caso de existir precipitado se corre el riesgo de que las colonias sean de menor tamaño y presenten reacciones menos nítidas. Sin embargo el precipitado no perjudica el desarrollo bacteriano y puede eliminarse por filtración con papel filtro.

Agar Pseudomonas F

Peptona de caseína	10.0 g
Peptona de carne	10.0 g
Sulfato de magnesio	1.5 g
Hidrogenofosfato dipotásico	1.5 g
Agar-agar	12.0 g
Glicerina	10.0 ml
Agua	1 000.0 ml

pH después de esterilizar  $7.1 \pm 0.2$

Disolver en agua los componentes sólidos, adicionar la glicerina. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar los tubos en posición inclinada o bien verter en placas.

Agar Pseudomonas P

Peptona de gelatina	20.0 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato potásico	10.0 g
Agar-agar	12.6 g
Glicerina	10.0 ml
Agua	1 000.0 ml
pH después de esterilizar $7.2 \pm 0.2$	

Disolver en agua los componentes sólidos, adicionar la glicerina. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar los tubos en posición inclinada o bien verter en placas.

Caldo Cistina Selenito

Mezcla de peptonas	5.0 g
Lactosa	4.0 g
Fosfato de sodio	10.0 g
Selenito ácido de sodio	4.0 g
Cistina	0.01 g
Agua	1 000.0 ml
pH final $7.0 \pm 0.2$	

Suspender 23 g del polvo en un litro de agua desionizada. Mezclar bien y calentar ligeramente hasta que el medio se disuelva. Envasar en tubos de ensaye, preferiblemente con tapas de rosca, volúmenes entre 10 y 15 ml por tubo. Esterilizar a vapor fluente durante 15 minutos. No en autoclave. No sobrecalentar. Puede durar hasta 3 meses en refrigeración.

Agar Sulfito y Bismuto

Mezcla de peptonas	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato disódico	4.0 g
Sulfato ferroso	0.3 g
Indicador de sulfito de bismuto	8.0 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20.0 g
Agua	1 000.0 ml
pH final $7.5 \pm 0.2$	

Suspender el polvo en un litro de agua, mezclar bien y remojar el medio deshidratado de 10 a 15 minutos para obtener un buen gel. Hervir no más de un minuto agitando continuamente para que se disuelva completamente el agar.

Dejar que el medio se enfríe a 45°C y sin dejar de agitarlo vacíe en cajas de Petri no menos de 20 ml de medio fluido. Las placas deben permanecer parcialmente descubiertas hasta que se seque la superficie del medio y usarlos el mismo día. Evite el sobrecalentamiento.

### 2.3 MEDIOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

#### Medio Basal O/F (de Hugh y Leifson)

Peptona Caseína	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	0.3 g
Azul bromotimol	0.03 g
Agar	2.5 g
Agua	1 000.0 ml
pH final 7.1 ± 0.2	

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia, hasta disolver el agar. Agregar 10 ml de solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración (o del azúcar apropiado) por cada 100 ml del medio fluido, mezclar y distribuir asépticamente 5 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 118°C durante 10 minutos a fin de evitar la degradación del azúcar. El medio tiene un color verde.

#### Medio Indol Ornitina (MIO)

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	10.0 g
Triptona	10.0 g
L-ornitina	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	2.0 g
Bromocresol púrpura	0.02 g
Agua	1 000.0 ml
pH final 6.5 ± 0.2	

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua, remojar unos 5 minutos, calentar a ebullición. Distribuir porciones de 4 ml en tubos de 10 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio Indol Nitrito

(Medio de tripcaseína y nitrato)

Peptona de caseína	20.0 g
Fosfato disódico	2.0 g
Dextrosa	1.0 g
Nitrato de potasio	1.0 g
Agar	1.0 g
Agua	1 000.0 ml

pH final  $7.2 \pm 0.2$ 

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Agregar 2 g de agar en el caso de hacerse movilidad y detección de gas. Calentar agitando continuamente y hervir durante más o menos un minuto hasta disolución total del medio. Envasar en tubos de ensayo hasta la mitad de su altura y esterilizar en autoclave durante 15 minutos. Si se prepara el medio semisólido, dejar que se solidifiquen los tubos en posición vertical.

Medio Rojo de Metilo Voges Proskauer

Peptona especial No. 1	7.0 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	5.0 g
Agua	1 000.0 ml

pH final  $6.9 \pm 0.2$ 

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua, mezclar bien, si es necesario calentar un poco hasta disolución total. Distribuir y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Agar Citrato de Simmons

Fosfato dehidrogenado de amonio	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Agar	15.0 g
Azul bromotimol	0.06 g
Agua	1 000.0 ml

pH final  $6.9 \pm 0.2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución.

Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1 a 1,5 cm. Se puede emplear también como medio en placas.

#### Caldo Urea

Urea	20.0 g
Fosfato monopotásico	9.1 g
Fosfato de sodio	9.5 g
Extracto de levadura	0.1 g
Rojo de fenol	0.01 g
Agua	1 000.0 ml
pH final 6.8 ± 0.2	

Disolver 38,61 g en 1 000 ml de agua, calentando en caso necesario a 60°C como máximo. Esterilizar por filtración o tras distribución a razón de 3 ml por tubo; o bien esterilizar con cuidado en marmita de vapor durante 5 minutos. No esterilizar en autoclave.

#### Agar Lisina Hierro

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
L-lisina	10.0 g
Citrato férrico-amónico	0.5 g
Trisulfato de sodio (anhidro)	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15.0 g
Agua	1 000.0 ml
pH final 6.7 ± 0.2	

Suspender el medio deshidratado, remojar unos 15 minutos, calentar para disolver los ingredientes agitando con frecuencia y hervir durante un minuto o hasta disolución completa.

Distribuir en porciones de 4 ml en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121°C. Dejar solidificar en posición inclinada a tener 4 cm de un extremo y 2,5 cm sesgado. Cerrar con cuidado las tapas a fin de evitar pérdidas de agua por evaporación.

Agar de hierro y triple azúcar.

Mezcla de peptonas	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Dextrosa	1.0 g
Sulfato de amonio férrico	0.2 g
Rojo fenol	0.025 g
Agar	13.0 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agua	1 000.0 ml

pH final 7.3 ± 0.2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 118°C durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.

Agar DNA azul toluidina

Acido desoxirribonucleico (DNA)	0.3 g
Agar	10.0 g
Cloruro de calcio (anhidro)	0.0011 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Azul O toluidina	0.083 g
Tris (hidroximetil) aminometano	6.1 g

Agua 1 000,0 ml Disolver el Tris (hidroximetil) aminometano en un litro de agua. Ajustar el pH a 9.0, adicionar los demás ingredientes excepto el azul O toluidina y calentar a ebullición para su disolución. Añadir al medio el color azul O toluidina. Distribuir en cajas Petri o portaobjetos.

Caldo de Lisina y Descarboxilasa

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
L-Lisina	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua	1 000.0 ml
pH final $6.8 \pm 0.2$	

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua. Distribuir en porciones de 5 ml en tubos con tapón de rosca. La tapa debe de estar algo floja para permitir un buen intercambio de gases. Apretarla bien al terminar la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio SIM

Peptona de caseína	20.0 g
Peptona de carne	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5 g
Agua	1000.0 ml
pH final $7.3 \pm 0.2$	

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, agitando frecuentemente. Remojar durante 10 minutos y hervir a ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos de ensayo a una altura de unos 4cm. y esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

## Anexo II

### BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA

#### 1.- GENERALIDADES

Las regulaciones contenidas en este artículo son las minimas requeridas de las Buenas Practicas de Manufactura para la preparación de medicamentos.

Están hechas con el fin de establecer mecanismos de control en los métodos de manufactura, proceso, empaque y embalaje de fármacos, para asegurar que tales fármacos cumplen los requerimientos de seguridad, identidad y potencia, así como de las características de calidad y pureza para los cuales han sido diseñados.

#### 2.- ORGANIZACIÓN Y PERSONAL

- ☹☹☹ Establecer las responsabilidades de la unidad de calidad, ya que su función es aprobar o rechazar los procedimientos y/o especificaciones que imparten la identidad, fuerza, calidad y pureza del fármaco.
- ☹☹☹ Personal calificado, es decir debe tener educación, entrenamiento y experiencia para realizar sus funciones. Además debe existir el personal adecuado en número según las actividades a realizar.
- ☹☹☹ Responsabilidades del personal, debe guardar todas las medidas higiénicas y de comportamiento según las áreas donde realice su actividad.

#### 3.- EDIFICIOS E INSTALACIONES

- ☹☹☹ El diseño y características de construcción, deben ser del tamaño adecuado y específico, suficiente para evitar contaminación y mezclas durante las operaciones diarias.
- ☹☹☹ Debe de contarse con la cantidad de luz suficiente en todas las áreas.
- ☹☹☹ Debe existir un adecuado sistema de ventilación, contar con equipo adecuado para controlar la presión, polvo, humedad y temperatura, los sistemas de filtración de aire debe incluir prefiltros y filtros para material particulado.
- ☹☹☹ Debe contarse con adecuados procedimientos de desecho los cuales deben disponerse de manera segura y sanitaria.

- Sanitización. Los edificios usados en la manufactura, producción, empaque y/o embalaje deben mantenerse limpios y en condiciones sanitarias libres de roedores, pájaros, insectos y otras plagas. La basura y residuos orgánicos deben eliminarse en tiempos y en forma sanitaria.
- Deben existir, programas, procedimientos, asignación de responsabilidades, materiales y equipos para la limpieza de instalaciones.
- Debe de contarse con los programas de mantenimiento preventivo, así como de las instalaciones adecuadas.

#### 4.- EQUIPO

- El equipo usado en la manufactura, proceso, empaque y embalaje debe ser del diseño, tamaño y capacidad adecuados, facilitando siempre su limpieza.
- La construcción de los equipos debe ser de material que no reaccione con el principio activo, ni cambie alguna de las propiedades de identidad, fuerza, calidad o pureza del mismo. Las sustancias necesarias para la operación de equipos tales como lubricantes o aceites, no deben estar en contacto con el principio activo.
- Todos los equipos y utensilios deben limpiarse, mantenerse y sanitizarse en intervalos previamente establecidos para prevenir mal funcionamiento o contaminación que afecte la calidad del activo. Deben establecerse procedimientos de operación para cada actividad, así como de esquemas de limpieza y Sanitización, indicando al responsable de la actividad y debe guardarse la evidencia documental de tales actividades.
- El equipo automático, mecánico o electrónico, es necesario realizar pruebas de óptimo funcionamiento, además de calibraciones e inspecciones necesarias, de acuerdo a programas previamente establecidos. Además debe contar con los controles necesarios para evitar al personal no autorizado el acceso a equipos como computadoras y previniendo el mal uso de la información que en ella se contenga.
- Los filtros para líquidos usados en la manufactura o empaque de fármacos inyectables para uso humano no deben liberar fibras (asbesto), por lo que es indispensable que sean de materiales que no liberen fibras, recomendándose filtros con un tamaño promedio de porosidad de 0.22 micras.

## 5.- CONTROLES DE LABORATORIO

 Requerimientos generales.

 Control de calidad debe revisar y aprobar borradores para el establecimiento de especificaciones, estándar, planes de muestreo, procedimientos y métodos de prueba.

 Todos los requerimientos de GMP's deben seguirse y documentarse al momento que se lleven a cabo, registrando y justificando cualquier desviación.

 Se debe contar con los controles de laboratorio científicamente establecidos, además de especificaciones, estándares, paneles de muestreo, procedimientos de prueba. Todo debe estar diseñado para asegurar la identidad, pureza, potencia y calidad.

Los controles de laboratorio deben contener:

-  Cumplimiento contra especificaciones escritas para la aceptación de cada lote de componente, contenedores, cierres o etiquetas usadas en la manufactura, procesamiento, empaque o almacenaje.
-  Las especificaciones deben incluir una descripción del muestreo y análisis.
-  Las muestras deben ser representativas y adecuadamente identificadas.
-  Cumplimiento contra especificaciones y descripción de muestreo y análisis de producto en proceso, así como para producto terminado.
-  Calibración de instrumentos de acuerdo a programas escritos que impliquen direcciones específicas, así como límites de precisión y exactitud. Acciones correctivas cuando sean necesarias.

 El análisis y liberación para su distribución.

 Cada carga de producto terminado debe cumplir satisfactoriamente con las especificaciones incluyendo identidad y potencia de cada ingrediente activo antes de ser liberado.

 Cada lote debe de cumplir con la pruebas microbiológicas.

- 📄 Los planes de muestreo y análisis deben estar indicados en procedimientos por escrito, así como los criterios de aceptación para análisis y muestreos, además de los controles estadísticos.
- 📄 La exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos debe ser validada y documentada.

#### Prueba de estabilidad

- 📄 Debe existir un programa escrito para determinar la estabilidad de los productos, donde los resultados son utilizados para determinar las condiciones de almacenamiento y fechas de caducidad.
- 📄 El procedimiento debe incluir, tamaño de muestra e intervalo de muestreo basado en criterios estadísticos, en diferentes condiciones de almacenamiento, utilizando métodos de análisis confiables y utilizando el mismo tipo de contenedor que será utilizado para su embarque, con el número de lotes adecuados. Se puede utilizar pruebas de estabilidad acelerada junto con estudios básicos de estabilidad.

#### Requerimientos de pruebas especiales

- 📄 Para cada carga de productos que así lo requiera debe realizarse la prueba de estabilidad y/o endotoxinas bacterianas con su respectivo procedimiento.

#### Muestra de reserva o muestras de retención.

- 📄 Deben existir muestras de reserva o muestras de retención de cada embarque y de cada ingrediente activo, la muestra de reserva debe ser mínimo dos veces la cantidad necesaria para todas las pruebas analíticas, exceptuando la prueba de esterilidad y Pirogénos, tales muestras de reserva deben estar retenidas por un año posterior a la fecha de caducidad, además de existir un lugar adecuado para su almacenaje.

#### Animales de laboratorio

- 📄 Los animales de laboratorio usados en las pruebas de componentes, materiales en proceso, o fármacos debe cumplir con especificaciones, ser mantenidos y controlados en un lugar adecuado. Deben ser identificados y tener cada animal su registro de comportamiento.

## 6.- REGISTROS Y REPORTES

- ✍ Deben existir registros de producción, control y distribución específicamente asociados con lotes de fármacos los cuales deben ser retenidos al menos por un año después de la fecha de expiración del lote. Deben ser reportados originales o en su defecto estar en copias
  
- ✍ Debe existir registros de componentes, contenedores de producto, cierres y etiquetas. Los resultados de algunas pruebas o exámenes realizados y las conclusiones derivadas de lo anterior.
  
- ✍ Para asegurar la uniformidad entre lote y lote, el procedimiento maestro y los registros de control de cada producto, incluyendo el tamaño del lote, deben ser preparados, fechados y firmados por una persona y verificarse, fecharse y firmarse por una segunda persona.
  
- ✍ Lote de producción y registros de control. Estos deben ser preparados por cada lote de medicamento y debe incluir información completa relacionada a la producción y control de cada lote.
  
- ✍ Registros de laboratorio. Estos deben incluir los datos completos derivados de todas las pruebas necesarias para asegurar la conformidad con especificaciones establecidas y estándares. Debe contener una descripción de la muestra recibida para prueba con identificación de fuente de donde se tomó, cantidad, número de lote u otro código distintivo, datos de cuando fue tomada la muestra y de cuando fue recibida en el laboratorio para sus pruebas. Debe existir un registro de todos los datos obtenidos en el curso de las pruebas, incluyendo gráficas, cartas y espectro de los instrumentos de laboratorio, apropiadamente identificados para demostrar lo específico del componente, contenedor del producto, cierres, material en proceso, medicamento y lote examinado. Deben mantenerse los registros de calibración así como su periodicidad de instrumentos de laboratorio y aparatos.

### ANEXO III

#### PRUEBAS BIOQUÍMICAS API

##### PRUEBAS BIOQUÍMICAS

###### Prueba en TSI

Sembrar el cultivo puro sometido a ensayo tanto por estría en la superficie inclinada como en la columna vertical, mediante estría central. Incubar 48 horas a 37°C.

Interpretación de resultados

- A = Viraje a rojo por formación de álcali.
- OA = Sin alteración del color original del medio de cultivo o rojo por formación de álcali.
- S = Viraje a amarillo, por formación de ácido.
- SG = Viraje a amarillo y formación de gas.
- + = Ennegrecimiento por formación de H<sub>2</sub>S.
- = Ausencia de ennegrecimiento.

###### Prueba en LIA

Sembrar el cultivo puro sometido a ensayo, tanto por estría sobre la superficie inclinada como por picadura central en la columna vertical subyacente. Incubar de 16-18 horas a 37°C.

Interpretación de resultados

- Violeta = Viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol por la descarboxilación de lisina y la consecuente alcalinidad.
- Amarillo = Fermentación de glucosa con la consecuente acidez del medio.
- Negro = Formación de coloración negra por el H<sub>2</sub>S y producción de sulfato de hierro.

###### Prueba en medio basal O/F (de Hugh y Leifson)

A partir del cultivo puro sometido a ensayo, que se encuentre lo más posible en la fase logarítmica de multiplicación, sembrar por el procedimiento de picadura hasta el fondo, un tubo con recubrimiento de parafina y otro tubo sin tal recubrimiento para cada carbohidrato elegido. Incubar 48 horas como mínimo a la temperatura de 35°C.

Interpretación de resultados

- Amarillo en ambos tubos = Fermentación del correspondiente carbohidrato.
- Amarillo en tubo no recubierto = Degradación oxidativa del carbohidrato. Oxidación en la superficie.
- Movilidad = Si la turbidez se extiende en la totalidad del medio.
- Gas = Observar formación de gas.

### Prueba en agar citrato de Simmons

Sembrar el cultivo puro por estría, en la superficie del medio de cultivo e incubar de 24 a 48 horas a 37°C.

Interpretación de resultados

Positivo = Medio de cultivo azul oscuro.

Negativo o inhibido = Sin cambio.

### Prueba en caldo urea

Sembrar masivamente con el cultivo puro, objeto de ensayo.

Incubar hasta 48 horas a 37°C.

Interpretación de resultados

Rojo = Urea positivo.

Amarillo = Urea negativo.

### Prueba en medio MR-VP

Procedimiento

Sembrar en dos tubos de caldo MR-VP con el cultivo puro, objeto de investigación. Incubar hasta 4 días a 37°C.

A continuación se realizan los ensayos:

Prueba del rojo de metilo: añadir al primer tubo unas 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo.

### Prueba de Voges-Proskauer:

Al segundo tubo se le añaden 5 ml de la solución de sulfato de cobre según Leifson o 3 ml de reactivo de Barritt y un ml de hidróxido de potasio al 40% o 5 ml de reactivo de O'Meora. En caso positivo se presenta para los dos primeros métodos después de algunos minutos, un viraje a rojo. Con el reactivo de O'Meora aparece en caso positivo y tras frecuente agitación, una coloración rosa al cabo de unos 20 minutos, iniciándose en la superficie y que se intensifica en el transcurso aproximado de 2 horas.

Interpretación de resultados

De anaranjado a rojo = positivo por utilización de glucosa.

De anaranjado a amarillo = negativo.

Rojo = Positivo, por formación de acetoína a partir de glucosa.

Sin reacción = negativo.

### Prueba en Medio indol nitrito

#### Formación de nitritos:

Para investigar nitritos utilice 3 tubos separados; uno para el control positivo (*E. coli*), otro para el control negativo y el tercero para la prueba con la cepa en estudio. Inocule masivamente cada tubo por punción. Incube a 35°C de 12 a 24 horas. Agregue aproximadamente 10 gotas (mezcla de partes iguales de las soluciones A+B) del reactivo Griess-Ilosvays.

#### Interpretación de resultados

La formación de un color rojo en uno o 2 minutos indica reducción de nitratos a nitritos (prueba positiva). Si la cantidad de nitritos es elevada el color rojo cambia a amarillo.

Si no aparece color, agregue a los tubos una pizca de zinc en polvo (libre de nitratos y de nitritos)

Observe si se forma el color rojo o el cultivo permanece incoloro.

Si no hubo reducción del nitrato presente en el medio de cultivo por el microorganismo, el zinc lo reducirá a nitrito y se formará un color rojo al reaccionar con el reactivo de Griess-Ilosvays. La prueba entonces será negativa (ausencia de nitrata).

Si no aparece color, esto nos indica que el germen redujo el nitrato presente en el medio de cultivo hasta más allá de la formación de nitritos, posiblemente llegando la reacción hasta nitrógeno gaseoso. La prueba entonces es positiva (presencia de nitrata).

### Formación de indol

Recubrir el medio con una capa de aproximadamente 0,5 cm de altura del reactivo del indol según Kovacs.

En presencia del indol libre, se presenta al cabo de pocos minutos una coloración rojo cereza en la capa del reactivo.

### Prueba en medio SIM

#### Procedimiento

El cultivo puro sometido a examen se siembra por punción en la capa superior del medio de cultivo y se incuba de 18-24 horas a 37°C.

#### Interpretación de resultados

La movilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de la picadura.

La no movilidad se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal. La formación de H<sub>2</sub>S se reconoce por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento.

La demostración del indol se efectúa mediante el reactivo de Kovacs. La formación del indol da lugar a una coloración rojo púrpura de la capa de reactivo.

También puede usarse con el mismo propósito la tira de papel filtro impregnada con una solución de ácido oxálico. Esta se coloca seca, en la boca del tubo, virando a un color rosado en el caso de formación de indol.

### Prueba en medio MIO

#### Procedimiento

Los cultivos son inoculados por punción en el medio MIO preparado en tubos y se incuban de 18-24 horas a 35°C.

Se leen las reacciones de movilidad y de ornitina descarboxilasa antes de agregar el reactivo de Kovacs para la prueba de indol.

#### Interpretación de resultados

La movilidad es indicada por turbidez del medio o por crecimiento extendido a partir de la línea de inoculación.

La ornitina descarboxilasa es indicada por el color púrpura del medio.

La ornitina negativa produce un color amarillo, en el fondo puede ser púrpura al final.

Para la prueba de indol se añaden de 34 gotas de reactivo de Kovacs, y se agita suavemente el tubo. La aparición de color rosa o rojo en el reactivo se interpreta como prueba positiva de indol.

Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

### Prueba en caldo lisina descarboxilasa

#### Procedimiento

Los tubos con el caldo se inoculan con los microorganismos de prueba y se incuban durante 24 horas de 32-35°C o si se prefiere a 37°C.

Los bacilos entéricos producen ácido en la fermentación inicial de dextrosa, ocasionando un cambio de color amarillo.

Los cultivos que también producen descarboxilación de la lisina, forman cadaverina y el caldo vuelve a tomar el color púrpura alcalino.

#### Interpretación de resultados

Un color amarillo después de 24 horas indica un resultado negativo.

El color púrpura es un resultado positivo que indica la descarboxilación de la lisina.

## **BIBLIOGRAFIA**

## XVI. BIBLIOGRAFÍA

- 1.0 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de Medicamentos. NOM-059-SSA1-1993
- 2.0 Collins, C.H., Lyne, P. M., Grange, J. M. 1999 Microbiological Methods Editorial Butterworth Heinemann. Edición 7ª Pagn. 11-18.
- 3.0 Valcarcel, A. Rios., 1995. La Calidad en los Servicios Analíticos. M. Editorial Reverte S.A. Edición 1ª Pags. 13-18, 337-381.
- 4.0 Easte, M.C. 2003. Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry. Edición 1ª. Pags. 41-49.
- 5.0 Camacho, J. 2005. Buenas Prácticas de Fabricación. Consultoría y Capacitación, S. C.
- 6.0 Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt, Alemania, Merck E. 1990.
- 7.0 Food and Drug Administration (FDA), 1993. Guía para las inspecciones de Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de productos farmacéuticos, material recopilado por la Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C (AFM) Julio 1993
- 8.0 Garcia, R. J.A. Picazo, J.J. 2000. Compendio de Microbiología. Editorial Hartcourt Pags.15-29.
- 9.0 Singleton, P. 2004. Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina. Editorial Acribia. Edición 1ª Pags. 2-11 y 108-112
- 10.0 Herrera T., y Ulloa M. 1990. El reino de los Hongos micología básica y aplicada. Fondo de Cultura Económica, Edición 1ª. Pags. 36-50.
- 11.0 Brooks, G.F., Morse, S.A., Butel, J.S 1999. Microbiología Médica. Jawetz, Melnick y Adelberg. Editorial el Manual Moderno 16ª. Edición 16ª Pags. 3-9 y 709.
- 12.0 Trinidad, S. J. 2003. Fundamentos de Microbiología y Parasitología. Editorial Mendez Editores. Pags. 50-61

- 13.0 Reglamentos de Insumos para la salud, publicado el 4 de Febrero de 1998 en el Diario Oficial de la Federación.
- 14.0 Romero, R. A. 2002 .Elaboracion de una base de datos para el control de documentos generados en el laboratorio de Control de Calidad. Reporte final de servicio social. Facultad de estudios Superiores Zaragoza.
- 15.0 Garcia, M., Elizalde C. 2004. Elaboracion y actualizacion de PNO's para los laboratorios farmaceuticos Zaragoza. Reporte final de servicio social. Facultad de estudios Superiores Zaragoza.
- 16.0 Norma Oficial Mexicana, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Química farmacéuticas dedicados a la fabricación de Medicamentos, NOM 112-SSA-1-1994.
- 17.0 Guidance for industry, chages to an aproved NDA or NDA 1999.
- 18.0 Guias de practicas adecuadas de manufactura para cuartos limpios 1989.
- 19.0 Norma oficial Mexicana, que establece las especificaciones sanitarias de los Medios de Cultivo NOM-065-SSA-1-1993.
- 20.0 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Ed 2004 Tomo 1 y 2.
- 21.0 Clavell. L. Pedique. 2ª edicion 1992. Microbiologia manual de metodos generales.
- 22.0 Cano, R. Sara 2006. Metodos de analisis microbiologico Normas ISO .
- 23.0 Metodo para la cuenta de bacterias aerobias en placa. NOM-092-SSA-1-1994.
- 24.0 LIM Mc Graww Hill. 1998. Microbiologia.
- 25.0 Comité de Elaboración de Guias Oficiales de Validación de la Dirección general de Insumos para la salud, S.S.A., 1990.

- 26.0 Norma ISO 17025 Medios de Cultivo y reactivos.
- 27.0 <http://www.joseacortes.com/practicas/index.htm>
- 28.0 Ramirez, J. Violeta. 2006 Elaboracion de procedimientos normalizados de operación requeridos para el control microbiológico de medicamentos esteriles. Para obtener el titulo de quimico farmaceutico biologo en la facultad de estudios superiores cuautitlan.
- 29.0 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D.F.
- 30.0 Izaguirre, C. Daniela. 2007 Elaboracion de Procedimientos Normalizados de Operación para un sistema de documentacion en un lab farmaceutico. Trabajo profesional para obtener el titulo de Quimico Farmaceutico Biologo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan,
- 31.0 <http://es.wikipedia.org/wiki/Microbio>
- 32.0 [http://es.wikipedia.org/wiki/Sistema\\_de\\_gesti%C3%B3n\\_de\\_la\\_calidad](http://es.wikipedia.org/wiki/Sistema_de_gesti%C3%B3n_de_la_calidad)
- 33.0 [http://www.cientic.com/tema\\_monera\\_img5.html](http://www.cientic.com/tema_monera_img5.html)
- 34.0 <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/03-005N/Maczka.pdf>  
3M 1995-2006
- 35.0 Guía de practicas adecuadas de manufacturas para cuartos limpios. Monografía técnica No. 1 CIPAM, México 1989.
- 36.0 CFR 21 seccion 211 Revised as april 2003 (BPD)
- 37.0 GCP Qualyti Audit manual Sayrere James E "a edition Interpham Press. Inc.(BPD)
- 38.0 Bermejo, A. Yolanda. 2004. Auditoria microbiologica investigacion de campo para conocer la calidad de los laboratorios de microbiologia.
- 39.0 Guía de Validación de medios de cultivo,1990. Comité Nacional de Validación.

- 40.0 Calibration and testing Laboratories. ISO 9000-ISO 17025
- 41.0 Buenas prácticas de laboratorio de Vecchi Ingenieros, 1991.
- 42.0 Rústica, Granados y Villaverde. Tomo 2: 1998. Bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Microbiología. Pag 364.
- 43.0 Sabater, J. Buenas practicas de laboratorio y garantia de calidad. Principios basicos. Ediciones diaz de Santos S.A.
- 44.0 Stebbing, L. 1991 Compañía editorial Continental SS de CV. Aseguramiento de la Calidad. El camino a la eficiencia y la competitividad.
- 45.0 Selman, V. Yazmin. Desarrollo de un sistema de documentacion para el manejo de desviaciones, cambios y procedimientos de fabricacion Facultad de Quimica.