

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**PROPUESTA DE UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS
DE INYECTABLES Y VACUNAS PARA UN LABORATORIO DE CONTROL
DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

**RAMIRO ARMANDO CERON LOPEZ
ROXANA MARIA OSORIO**

16 DE FEBRERO
DE 1841

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

NOVIEMBRE DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

MSc. Rufino Antonio Quezada Sánchez

Secretario General

Lic. Douglas Vladimir Alfaro Chávez

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Decano

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria

Licda. Morena Lizette Martínez de Díaz

Comité de Trabajos de Graduación

Coordinadora General

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Area de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos, Cosméticos y Veterinarios:

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

Asesora de Area de Industria Farmacéutica, Cosmética y Veterinaria:

Licda. Mercedes Rossana Brito de Gámez

Docente Director:

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

DEDICATORIA

- A Dios todopoderoso y a la Virgen María: por darme el entendimiento y la sabiduría para llegar a culminar mi carrera.
- A mis padres Dina y Ramiro: por sus consejos y apoyo incondicional.
- A mi hermano Oscar Manuel (Q.D.D.G.): ya que gracias a él y a su confianza en mí estoy culminando mis estudios.
- A mi hermana Yeni: por su apoyo y por estar siempre a mi lado.
- A mi esposa: por su apoyo, paciencia y por estar siempre conmigo.
- A mis padrinos y primos: por recibirme en su hogar y por motivarme a seguir siempre adelante.

Ramiro Armando Cerón López

DEDICATORIA

- A Dios todopoderoso y a la Virgen María: por llenar mi vida de bendiciones y darme la fuerza para salir adelante.
- A mis padres Juan Manuel y Angelita (Q.D.D.G.): por todo su amor, dedicación, esfuerzo y sacrificio.
- A mi esposo: por ser también mi mejor amigo y mi fuerza para salir adelante.
- A mi amiga Paty: por ser una hermana para mí.
- A la Familia Chavarría Guerra: por ser mi segunda familia y brindarme su amistad durante todos estos años.
- A mis amigas Silvia de Vega, Claudia, Karen, Verónica, Karla y Roxana quienes siempre me apoyaron para salir adelante.

Roxana María Osorio

AGRADECIMIENTOS

- A Dios: por darme salud y permitirme coronar mi carrera profesional.
- A mis padres: por darme su apoyo y comprensión a lo largo de mi vida.
- A mis hermanos: por su ejemplo de hermandad, cariño y solidaridad.
- A mi esposa: por darme su amor y apoyo para salir adelante.
- A mis amigas Amanda y Aurita Estrada: por su amistad sincera.
- A nuestra asesora MSc. Evelyn Sánchez de Ramos: por brindar sus conocimientos y dedicación en el desarrollo de éste trabajo.
- A nuestras asesoras de área: Licda Odette Rauda Acevedo, Licda. Mercedes Rossana Brito de Gámez y MSc. Rocío Ruano de Sandoval, por que gracias a su experiencia profesional hemos culminado con éxito nuestra investigación.

Ramiro Armando Cerón López

AGRADECIMIENTOS

- A Dios: por darme la fortaleza y sabiduría para coronar mi carrera profesional.
- A mis padres: por darme su amor y apoyo cada día de mi vida.
- A mis hermanitos: por su amor sincero y ser mi inspiración para salir adelante.
- A mi esposo: por darme su amor, comprensión, apoyo y estar siempre a mi lado.
- A mi amiga Paty y familia: por su amistad sincera y estar conmigo en las buenas y en las malas.
- A mis compañeras de Farmacéutica Rodim: por su apoyo y colaboración para la realización de éste trabajo.
- A nuestra asesora MSc. Evelyn Sánchez de Ramos: por brindar sus conocimientos y dedicación en el desarrollo de éste trabajo.
- A nuestras asesoras de área: Licda Odette Rauda Acevedo, Licda. Mercedes Rossana Brito de Gámez y MSc. Rocío Ruano de Sandoval, por que gracias a su experiencia profesional hemos culminado con éxito nuestra investigación.

Roxana María Osorio

ÍNDICE

Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xx
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	24
3.1 Control de Calidad Microbiológico de Inyectables	24
3.1.1 Prueba de Esterilidad.	26
3.1.2 Prueba de Pirógenos.	27
3.1.2.1 Prueba de Pirógenos Método Biológico	28
3.1.2.2 Prueba de Pirógenos Método Bioquímico	29
3.2 Control de Calidad de Vacunas	30
3.2.1 Pruebas de Identidad	30
3.2.2 Ensayos de Potencia	31
3.2.3 Pruebas de Seguridad.	33
3.2.3.1 Vacunas Inactivadas: Inactivación Incompleta	33
3.2.3.2 Toxinas o Toxoides	34
3.2.3.3 Vacunas Vivas: Peligro de Reversión	34

3.2.4 Pruebas de Aplicación General	35
3.2.4.1 Prueba de Esterilidad: Bacterias y Hongos	35
3.2.4.2 Exentas de Toxicidad	35
3.2.4.3 Presencia de otras sustancias	36
3.2.4.4 pH	36
3.3 Procedimientos de Análisis Específicos para Algunas Vacunas	36
3.3.1 Vacuna Anticolérica	36
3.3.2 Vacuna Tosferina	38
3.3.3 Vacuna Fiebre Tifoidea	38
3.3.4 Vacuna Tuberculosis: BCG	39
3.3.5 Vacuna Meningitis	41
3.3.6 Vacuna Rabia	42
3.3.7 Vacuna Antigripal Inactivada	44
3.3.8 Inmunosueros para uso humano	46
3.3.8.1 Inmunosuero Botulínico	46
3.3.8.2 Inmunosuero Diftérico	47
3.3.8.3 Inmunosuero Tetánico	47
3.3.9 Inmunoglobulina Humana Normal	48

Capítulo IV

4.0 Diseño Metodológico	50
4.1 Tipo de Estudio	50
4.1.1 Estudio Prospectivo	50
4.1.2 Investigación Bibliográfica	50
4.1.3 Investigación de Campo	51

Capítulo V

5.0 Resultados

5.1 Diagnóstico sobre las normas que rigen los análisis microbiológicos de los medicamentos inyectables en los laboratorios fabricantes en El Salvador.	55
5.2 Establecimiento de las normas de trabajo para el personal en un área de análisis microbiológico de medicamentos estériles.	64
5.2.1 Entrenamiento de Personal	64
5.2.2 Normas Generales para el Personal en el Laboratorio de Microbiología.	65
5.2.3 Normas Específicas para el Personal que Ingresa a las Áreas Limpias.	65
5.2.4 Vestuario	67
5.3 Detalle de los procedimientos para monitoreo ambiental de áreas estériles y métodos de control para medios de cultivo y material de vidrio usados para el análisis microbiológico de inyectables y vacunas.	70
5.3.1 Monitoreo Ambiental de Áreas Estériles	70
5.3.2 Muestreo del Aire	71
5.3.2.1 Programas de Monitoreo del Aire	72
5.3.2.2 Métodos de Análisis Microbiológico del aire	74

5.3.3 Muestreo de Superficies	76
5.3.3.1 Método de Torunda	77
5.3.3.2 Método de Placa de Contacto	78
5.3.3.3 Método de Laminocultivo	78
5.3.4 Métodos para Controlar la Población Microbiológica de las Áreas Limpias	78
5.3.4.1 Métodos Físicos	79
5.3.4.2 Agentes Químicos	81
5.3.5 Limpieza y Sanitización de Áreas Limpias	86
5.3.6 Control de Calidad de Medios de Cultivo	88
5.3.6.1 Determinación de pH	89
5.3.6.2 Pruebas de Esterilidad	89
5.3.6.3 Pruebas de Promoción de Crecimiento	90
5.3.6.4 Pruebas de Estabilidad	90
5.3.7 Evaluación del Material de Vidrio	91
5.3.7.1 Integridad de la Cristalería	91
5.3.7.2 Verificación de pH	91
5.3.7.3 Determinación de Residuos Bacteriostáticos o Bactericidas.	92
5.3.7.4 Comprobación de Esterilidad	93
5.3.8 Métodos de Esterilización para Medios de Cultivo y Material de Vidrio.	95

5.4 Identificación de las características estructurales de un área de control de calidad microbiológico de inyectables y vacunas.	98
5.4.1 Factores Ambientales Externos	98
5.4.2 Características Estructurales de un Laboratorio de Análisis Microbiológico de Medicamentos Estériles	99
5.4.3 Secciones de un Laboratorio de Microbiología	101
5.4.3.1 Ingreso de Personal y Vestidores	101
5.4.3.2 Recepción de muestras	102
5.4.3.3 Estantería para el almacenamiento de utensilios, cristalería y medios de cultivo.	102
5.4.3.4 Preparación de Reactivos y Medios de Cultivo	102
5.4.3.5 Esterilización de cristalería, medios de cultivo y otros	102
5.4.3.6 Almacenamiento para materiales estériles.	103
5.4.3.7 Área Estéril	103
5.4.3.8 Incubadoras	104
5.4.3.9 Lectura de Resultados	104
5.4.3.10 Bacterioteca	104
5.4.3.11 Recinto para Animales Vivos	105
5.4.3.12 Pruebas Biológicas	105
5.4.3.13 Oficina, Biblioteca y Archivos	106

5.5 Propuesta de Manual de Procedimientos para el análisis microbiológico de Inyectables y Vacunas.	108
5.5.1 Procedimientos Normalizados de Análisis.	108
5.5.2 Prueba de Esterilidad de Inyectables, Método Directo	
5.5.2.1 Muestra Líquida de 1 mL o menos.	113
5.5.2.2 Muestra Líquida de 1 mL – 40 mL	122
5.5.2.3 Muestra Sólida de 50 mg o menos.	131
5.5.2.4 Muestra Sólida de 50 mg – 300 mg	140
5.5.2.5 Muestra Sólida de 300 mg – 5 g	149
5.5.2.6 Muestra Sólida de 5 g o más	158
5.5.2.7 Muestra de antibióticos Liofilizados	167
5.5.3 Método de Filtración por Membrana	
5.5.3.1 Muestra Líquida Miscible en Medio Acuoso	177
5.5.3.2 Muestra Viscosa Miscible en Medio Acuoso	188
5.5.3.3 Muestra Líquida Bacteriostática o Fungistática	198
5.5.3.4 Muestra Oleosa	210
5.5.3.5 Muestra de Antibióticos Liofilizados	220
5.5.4 Prueba de Pirógenos	
5.5.4.1 Método Biológico	232
5.5.4.2 Método Bioquímico, Prueba de LAL	242
5.5.5 Vacunas	
5.5.5.1 Prueba de Esterilidad, Filtración por Membrana	255
5.5.5.2 Prueba de Toxicidad, Método Biológico	266
5.5.5.3 Pruebas de Seguridad, Método Biológico	272

Capítulo VI	
6.0 Interpretación de Resultados	279
Capítulo VII	
7.0 Conclusiones	285
Capítulo VIII	
8.0 Recomendaciones	289
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

ABREVIATURAS

ATCC	Colección de cultivos tipo americano
BCG	Vacuna contra la Tuberculosis hecha a partir del bacilo Calmette y Guérin.
cm	Centímetro
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología El Salvador.
CONSYTEC	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Perú.
°C	Grados centígrados
g	Gramo
HEPA	Arrastre de partículas de alta eficiencia
IgG	Inmunoglobulina G
Kg	Kilogramo
LAL	Limulus amebocito lisado
Medio MA	Medio Tioglicolato pH 7.1 ± 0.2
Medio ME	Medio Digerido Pancreático de Caseína de Soya pH 7.3
mL	Mililitro
mm	Milímetro

Rayos UV	Rayos ultravioleta.
Medio TSA	Medio Tripticasa soya agar.
UE	Unidad de endotoxina.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
UI	Unidades internacionales
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
V/V	Solución preparada volumen sobre Volumen.
µm	Micras.

FORMULAS

H₂O

Agua

CH₃CH₂OH

Alcohol etílico

NaCl

Cloruro de Sodio

C₆H₅OH

Fenol

I

Yodo

RESUMEN

El control de la calidad microbiológica de los medicamentos estériles tiene como objetivo garantizar la seguridad del producto a los pacientes.

Con la finalidad de realizar un diagnóstico sobre las normas que rigen los análisis microbiológicos de los medicamentos inyectables en los laboratorios fabricantes en El Salvador, se realizaron entrevistas en dos laboratorios y se determinó que basan sus procedimientos de análisis en libros oficiales tales como la Farmacopea de los Estados Unidos en sus ediciones 24 y 25 respectivamente, Farmacopea Británica y otras.

Deben cumplir además con las exigencias de las Buenas Prácticas de Laboratorio las cuales son evaluadas en inspecciones hechas por la Junta de Vigilancia de la Profesión Químico Farmacéutica.

En esta investigación se propone un manual de procedimientos microbiológicos para el análisis de inyectables y de vacunas. Los métodos aquí descritos han sido tomados de libros oficiales como la Farmacopea de los Estados Unidos edición 29 y otras publicaciones hechas por organizaciones internacionales.

Se incluye además información basada en las Buenas Prácticas de Laboratorio con respecto a las normas de trabajo que se aplican al personal, mantenimiento y monitoreo de áreas asépticas, evaluación de medios de cultivo y material de vidrio y las características estructurales y distribución de un laboratorio de microbiología.

La obtención de resultados en los análisis microbiológicos de inyectables y vacunas depende principalmente del elemento humano.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio dan lineamientos generales, los cuales si se aplican correctamente en cada uno de los procedimientos permiten disminuir el riesgo de fallas. Estas en conjunto con el empleo de manuales de procedimientos adecuados a las necesidades particulares de cada laboratorio permiten obtener resultados confiables y a su vez disminuir costos en los procesos.

Debido a lo anterior es recomendable que todo laboratorio de análisis microbiológico cuente con manuales de procedimientos basados en normas internacionales como las establecidas en los libros oficiales y que a su vez se basen en las Buenas Prácticas de Laboratorio.

I. INTRODUCCION

El control de calidad microbiológico de los medicamentos inyectables y de las vacunas es un sistema planificado de actividades cuyo propósito es garantizar la seguridad de su uso en los pacientes.

En El Salvador existen varios laboratorios fabricantes de medicamentos inyectables, estos se rigen bajo normas internacionales como las establecidas en libros oficiales: Farmacopea de los Estados Unidos en sus ediciones 29 y 30, Farmacopea Británica y otras; así como por los principios dictaminados por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Los productos elaborados son evaluados en su calidad microbiológica con la finalidad de establecer su seguridad e inocuidad.

Si un producto presenta un cierto grado de contaminación microbiana y ésta pasa inadvertida, puede traer consigo graves consecuencias en la salud de los pacientes a los que se les administre. Debido a ello los laboratorios nacionales han desarrollado programas de capacitación especializados para el personal encargado de realizar los análisis.

Durante la presente investigación se realizó un diagnóstico para conocer las normas que rigen los análisis microbiológicos en los laboratorios fabricantes de inyectables a nivel nacional, dicho diagnóstico se hizo por medio de entrevistas al personal que realiza los análisis.

La finalidad de ésta investigación fué la elaboración de un manual de procedimientos microbiológicos que permitan realizar un control adecuado de medicamentos inyectables y de vacunas, se incluyen ensayos para los diferentes tipos de muestra de acuerdo a sus características, su estado (sólido o líquido), sus propiedades (como en el caso de aquellas muestras con propiedades bacteriostáticas o fungistáticas) y otros.

El formato empleado para la elaboración del manual se tomó de la norma ISO/IEC 17025, para ser usado en todo laboratorio que efectúe análisis microbiológicos.

La investigación incluyó además otros temas relacionados con el control microbiológico de productos estériles, entre ellos se mencionan las características de las áreas limpias, mantenimiento de éstas, normas para el personal, manejo de medios de cultivo, material de vidrio y otros.



II OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer un manual de procedimientos microbiológicos de inyectables y vacunas para un Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Realizar un diagnóstico para conocer las normas que rigen los análisis microbiológicos que realizan los laboratorios fabricantes de inyectables a nivel nacional.
- 2.2.2 Establecer las normas de trabajo que debe seguir el personal dentro de un área de análisis microbiológico de medicamentos estériles.
- 2.2.3 Detallar los procedimientos para: a) monitoreo ambiental y b) métodos de control aplicados a los medios de cultivo y material de vidrio destinados al análisis microbiológico de inyectables y vacunas.
- 2.2.4 Identificar las características que debe reunir un área destinada al control de calidad microbiológico de inyectables y vacunas.
- 2.2.5 Elaborar un manual de procedimientos para el análisis microbiológico de inyectables y vacunas

CAPITULO III
MARCO TEORICO

MARCO TEÓRICO

CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO DE INYECTABLES

El Control de Calidad Microbiológico de los medicamentos es un sistema planificado de actividades cuyo propósito es asegurar un producto de calidad, incluyendo por tanto todas las medidas para garantizar que los medicamentos cumplan con las especificaciones establecidas de identidad, potencia y pureza durante su período de vida útil.

Los inyectables son preparaciones destinadas para ser administradas a través de la piel o los tejidos incluyéndose también el canal alimentario de manera que las sustancias activas son administradas, usando gravedad o fuerza, directamente en un vaso sanguíneo, órgano, tejido o lesión. ⁽⁸⁾

Los inyectables se clasifican en:

- Soluciones listas para inyectar.
- Sólidos secos para inyectar; medicamentos sólidos que con la adición de vehículos apropiados forman soluciones que reúnen los requerimientos para inyectables.
- Emulsiones; preparaciones líquidas de medicamentos disueltos o dispersados en un medio emulsionado apropiado
- Suspensiones; preparaciones líquidas de sólidos suspendidos en medio apropiado.

- Sólidos secos para suspensión, son medicamentos que con la adición de vehículos apropiados forman preparaciones que reúnen los requerimientos para suspensiones inyectables.
- Líquidos concentrados listos para ser disueltos antes de su administración.

También podemos hablar de soluciones intravenosas de gran volumen; esto se aplica a inyectables aplicados en una sola dosis por vía intravenosa y que contiene más de 100 mL.

Tenemos además inyectables de pequeño volumen, esto se aplica a aquellos que tienen 100 mL o menos.

El Control de Calidad de los medicamentos inyectables y de las vacunas se efectúa principalmente en dos niveles: durante el proceso de fabricación y sobre el producto en su envase final. Durante la fabricación, el análisis se efectúa sobre los materiales y productos utilizados en su producción; así como en las etapas intermedias del proceso.

En el caso del producto en su envase final se realizan controles físicos, químicos, y microbiológicos; en este caso es de interés particular el control microbiológico, el cual incluye la prueba de esterilidad y prueba de pirógenos.

3.1.1 PRUEBA DE ESTERILIDAD

El ensayo se aplica a las preparaciones que, según la Farmacopea de los Estados Unidos, USP 29, deben ser estériles, un resultado favorable significa que no ha sido encontrado ningún microorganismo en la muestra examinada en las condiciones del ensayo.

Un ensayo de esterilidad debe realizarse en condiciones que eviten todo riesgo de contaminación accidental del producto en el curso del ensayo, por ejemplo utilizando campanas de flujo laminar de aire estéril. Las precauciones tomadas para evitar tal contaminación no deben afectar a los microorganismos cuya presencia deba ponerse de manifiesto en el ensayo.

La eficacia de las precauciones observadas debe ser regularmente verificada por un control de aire y de las superficies de trabajo, efectuando paralelamente controles de preparaciones de las que se sabe que son estériles.

Para llevar a cabo las pruebas de esterilidad en ampollas, viales o frascos conteniendo productos líquidos, primero debe limpiarse la superficie exterior usando gasa o algodón estériles empapados con alcohol o éter. Debido a que muchos envases son llenados al vacío se debe introducir una aguja montada en una jeringa estéril de tipo graduado, para permitir la penetración de aire estéril a través de la jeringa. Posteriormente se procede a abrir el envase.

La muestra seleccionada es separada en dos porciones para ser sembrada en los medios adecuados; por ejemplo, para bacterias puede sembrarse en medio de Tioglicolato (usado para productos claros) o Tioglicolato alternativo (usado

para productos turbios, viscosos, altamente interferentes) incubar de 30° a 35 °C. Para levaduras y hongos filamentosos, puede escogerse el medio de Caseína de soya digerido (incubar de 20° a 25 °C).

Si los medios preparados se almacenan en envases no sellados pueden usarse durante 1 mes, siempre que se hayan evaluado con la prueba de promoción de crecimiento 2 semanas antes del uso.

Todos los medios anteriormente mencionados son los que ofrecen mayores garantías de crecimiento de los microorganismos contaminantes de tipo aerobio o anaerobio, razón por la cual es obligatorio realizar controles a los medios de cultivo: propiedades nutritivas, pruebas de bacteriostàsis y fungistàsis.

Existen dos técnicas para la realización de las pruebas de esterilidad:

- a) Método de Inoculación Directa (utilizando tubos de ensayo).
- b) Método Filtración por Membrana ⁽⁸⁾

La Farmacopea de los Estados Unidos en su edición 29 presenta tablas en las cuales se especifica el volumen de muestra a tomar de acuerdo al contenido de cada frasco. (Ver Anexo # 9)

3.1.2 PRUEBA DE PIROGENOS

Los pirógenos son productos del metabolismo microbiano, las sustancias pirógenas mas potentes son las endotoxinas, las cuales son constituyentes de la pared celular de las bacterias Gramnegativas y los hongos.

Las bacterias Grampositivas producen pirógenos pero de menor potencia y de naturaleza química diferente. Las endotoxinas son lipopolisacàridos de alto peso molecular y se ha demostrado que la porción lipídica es la responsable de la acción biológica, lo cual desencadena entre otros a los procesos febriles.

La presencia de pirógenos puede evaluarse en preparados parenterales mediante una prueba cualitativa de respuesta con fiebre en conejos, la prueba de endotoxinas bacterianas que es una prueba in Vitro basada en la formación de un gel o en la aparición de un color en presencia de endotoxinas bacterianas y el lisado de amebocitos del cangrejo herradura.

3.1.2.1 PRUEBA DE PIRÓGENOS POR EL MÉTODO BIOLÓGICO

Estas pruebas se basan en determinar la respuesta biológica de los animales de laboratorio, ante la presencia de agentes pirógenos.

Animales de Prueba: utilizar conejos de cepa Nueva Zelanda o similar, adultos, jóvenes, sanos, de peso no menor a 1.5 Kg, machos, ya que las hembras pueden presentar problemas en la interpretación, debido a las características intrínsecas de su sexo. Los conejos deben haber mantenido su peso con una dieta libre de antibióticos durante la semana anterior a la prueba.

Los animales deben mantenerse alojados en jaulas individuales en un local con temperatura ambiente uniforme (20° – 23°C, con una variación de \pm 3°C), sin ruidos o factores que exciten a los animales.

Todo el material, tanto de vidrio como agujas y jeringas deben ser libres de pirógenos, para lo cual se despirogenizan con calor seco a 250°C por lo menos durante 30 minutos. (13)

3.1.2.2 PRUEBA DE PIRÓGENOS POR EL MÉTODO BIOQUIMICO

PRUEBA DE LAL

La prueba de LAL es un método más rápido, sensible y menos caro que el método biológico. Para estandarizar la prueba, la USP a establecido una endotoxina de referencia contra la cual se estandarizan los lotes de lisado. De este modo, la sensibilidad del lisado se da en términos de endotoxinas (UE). (15)

El lisado de amebocitos del Limulus es un extracto acuoso de las células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura, el *Limulus polyphemus*. Actualmente en el mercado se encuentran disponibles viales de una sola prueba; como el Pyrotell, el cual contiene: extracto acuoso de amebocitos de *Limulus polyphemus*, 1.5 % v/v de albúmina sérica humana al 25%(estabilizante), 3 % de NaCl y otros iones adecuados, no se han añadido preservativos, reguladores (buffers) u otros ingredientes.

Este producto ofrece lotes individuales con diferentes tipos de sensibilidades que van desde 0.03 0.5 UE/mL, basados en el estándar de referencia de endotoxina de la USP (llamado también ERE). La sensibilidad (λ) es la concentración mínima de ERE que produce un coágulo firme bajo condiciones estándar. (12)

3.2 CONTROL DE CALIDAD DE VACUNAS

Las vacunas deben someterse a un control de calidad que asegure el cumplimiento de los estándares internacionales en cuanto a eficacia y seguridad, ya que una vacuna poco segura o mal tolerada es un peligro y una vacuna poco eficaz, una molestia.

El control de calidad en las vacunas intenta asegurar por un lado la eficacia y por otro lado la inocuidad de cada lote. Se efectúa principalmente en dos niveles: durante el proceso y sobre el producto final a granel o en su envase definitivo de acuerdo a las monografías de las farmacopeas. Estas regulan tanto las pruebas de identidad, potencia y seguridad así como las pruebas de aplicación general. Las vacunas combinadas o/y mixtas necesitan superar las pruebas obligadas para cada uno de los componentes por separado.

En nuestro caso, son de interés particular las pruebas microbiológicas en el producto final. ⁽¹¹⁾

A continuación se presentan algunas pruebas que se realizan a las vacunas para evaluar su calidad.

3.2.1 PRUEBAS DE IDENTIDAD:

Las pruebas de identidad permiten asegurar que el material contenido en la ampolla corresponde con lo etiquetado. La identidad de las vacunas bacterianas puede generalmente ser evaluada por una prueba de aglutinación in Vitro y por precipitación. Las vacunas de virus inactivados se prueban

observando la respuesta del anticuerpo específico que provocan en animales vacunados. En el caso de las vacunas de virus vivos se hace por neutralización de sus efectos citopáticos por el antisuero específico.

3.2.2 ENSAYOS DE POTENCIA:

Los ensayos de potencia empleados para evaluar a todas las vacunas están basadas en un número limitado de principios básicos y por lo tanto son similares en su diseño. La efectividad de dichas pruebas depende básicamente del uso de estándares apropiados, los animales de experimentación, el criterio de respuesta de los anticuerpos y otros.

En el caso de unas pocas vacunas en las cuales los principios activos son componentes microbianos altamente purificados, es posible asegurar su potencia por medio de técnicas fisicoquímicas o serológicas, por ejemplo por medio de los perfiles moleculares y pureza de los polisacáridos de vacunas meningocócicas y de vacunas pneumocócicas las cuales pueden ser rápidamente verificadas por técnicas de filtración de gel, o en el caso de la vacuna de la influenza en la cual se evalúa la hemaglutinina por difusión radial en azarosa. Muchas otras vacunas sin embargo pueden ser evaluadas por medio de técnicas biológicas en animales.

Muchas vacunas que contienen microorganismos muertos o sus productos son evaluadas en ensayos en los cuales se determina la habilidad de la vacuna de provocar la producción de anticuerpos en un grupo de animales de laboratorio. Este tipo de ensayos implica la vacunación de un grupo de animales

sanos, la extracción de muestras de sangre de cada animal después de cierto tiempo y la titulación de las muestras con la adición de los anticuerpos específicos para cada vacuna. Un ensayo similar ha sido descrito por la Farmacopea Británica para la vacuna de la difteria, con la excepción de que los resultados no son evaluados por medio de titulación de anticuerpos, sino que por medio de la inyección intradérmica de pequeñas cantidades de toxina diftérica en cada animal de prueba. Los animales con antitoxina, neutralizan la toxina y no presentan reacción, los que no tienen la antitoxina desarrollan un eritema en el área de la inyección. Una variante de este ensayo es usado para determinar la potencia de la vacuna de virus inactivado de la poliomielitis y consiste en la determinación de la cantidad de vacuna que provoca una respuesta de anticuerpos en el 50 % de un grupo de Guinea - pigs.

La potencia de muchas vacunas inactivadas puede ser determinada por medio de la prueba de protección 3 + 3 la cual consiste en la comparación de la eficiencia de la vacuna con su correspondiente estándar en animales de laboratorio, se utilizan grupos de 16 ratones o más y consiste en inyectar tres series de dosis de la vacuna estándar y tres series de la vacuna a ensayar, en ambos casos la dosis debe ser suficiente para inmunizar al 50 % de los ratones usados para el ensayo. Catorce días después todos los ratones son infectados artificialmente con el microorganismo patógeno contra el cual se supone que protege la vacuna. El número de animales inmunizados y los sobrevivientes, en cada uno de los grupos (hasta 6 grupos) es contado unos días después y usado

para calcular y estimar la potencia de la vacuna por medio de técnicas estadísticas. El estimado de la potencia se determina por comparación con el estándar, cuando se utiliza un estándar cuya potencia se expresa en unidades internacionales (UI) y con un límite de confianza apropiado.

3.2.3 PRUEBAS DE SEGURIDAD:

Debido a que muchas vacunas son producidas a partir de materiales básicos de alta patogenicidad, las pruebas de seguridad son parámetros de gran importancia. Estas proveen una garantía de la seguridad de cada lote producido. En el caso de las vacunas virales, éstas presentan problemas en las pruebas de seguridad más frecuentemente que las vacunas bacterianas.

3.2.3.1 VACUNAS INACTIVADAS: INACTIVACIÓN INCOMPLETA.

En vacunas elaboradas a partir de virus muertos el peligro potencial que presentan es la inactivación incompleta de éstos y la consecuente presencia de vida viral residual en la preparación. La prueba consiste en la inoculación de la muestra en cultivos de tejidos susceptibles o en animales susceptibles. Los tejidos son examinados para detectar efectos citopáticos y los animales para verificar síntomas de la enfermedad y evidencia histológica de infección en la autopsia. Esta prueba es de vital importancia en la vacuna de la poliomielitis.

3.2.3.2 TOXINAS O TOXOIDES.

Las vacunas que contienen toxoides como la difteria y el tétanos, deben ser evaluadas para determinar una adecuada detoxificación, para ello se inoculan Guinea – pigs los cuales son específicamente sensibles a las toxinas de la difteria y el tétanos.

3.2.3.3 VACUNAS VIVAS (ATENUADAS): PELIGRO DE REVERSIÓN.

En vacunas virales atenuadas el peligro potencial está asociado con la reversión del virus (durante el proceso de fabricación) a un grado de virulencia capaz de causar la enfermedad. Generalmente esta posibilidad es controlada por medio de una selección muy cuidadosa de las células, en especial cuando se trata de la vacuna de la poliomielitis. La técnica consiste en la inoculación intra espinal en monos de la vacuna a ensayar, empleándose como referencia una vacuna cuya seguridad esté comprobada. Se realiza una comparación de las lesiones neurológicas y síntomas que cualquiera de éstas causen. Si la vacuna a prueba causa anomalías excesivas con respecto a las causadas por la de referencia no pasa la prueba.

También puede realizarse la prueba usando Guinea – pigs para excluir la presencia de una virulencia anormal en la vacuna BCG.

3.2.4 PRUEBAS DE APLICACION GENERAL

Adicionalmente a las pruebas destinadas a estimar la potencia y excluir los peligros particulares de cada una de las vacunas; se realizan pruebas de aplicación más general.

3.2.4.1 PRUEBA DE ESTERILIDAD: BACTERIAS Y HONGOS

Con la excepción de la vacuna contra la viruela y la BCG, todas las vacunas deben ser bacteriológicamente y micológicamente estériles. En cada lote de un producto el número de muestras depende del tamaño del lote y está sujeto a regulaciones farmacopéicas. El método más usado es la filtración por membrana, la cual permite el análisis de volúmenes grandes de muestra sin necesidad de dilución. Este método es capaz de detectar bacterias aerobias, anaerobias y hongos. ⁽¹¹⁾

3.2.4.2 EXENTAS DE TOXICIDAD

El propósito de esta prueba es excluir la presencia de contaminantes altamente tóxicos. Se toman 5 ratones con peso de 17 a 22 gramos y dos Guinea – pigs de 250 – 350 gramos de peso y se inoculan con una dosis humana o 1 mL de la vacuna. Todos deben sobrevivir por siete días sin presentar síntomas de enfermedad.

3.2.4.3 PRESENCIA DE OTRAS SUSTANCIAS.

PRESENCIA DE ALUMINIO Y CALCIO: la presencia de aluminio en las vacunas que contienen hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio como coadyuvantes es limitada a 1.25 mg por dosis y es usualmente estimada por métodos químicos. La cantidad de fosfato de calcio es limitada a 1.3 mg por dosis y es evaluada por fotometría de llama.

FORMALINA LIBRE: la inactivación de toxinas bacterianas con formalina puede dejar residuos de formalina libre en el preparado. La concentración es estimada por el desarrollo de color con aceticona, no debe exceder el 0.02 %.

CONCENTRACION DE FENOL: cuando el fenol, es usado para preservar las vacunas de la tifoidea y el cólera, su concentración no debe exceder el 0.5 %.

3.2.4.4 pH: debe estar entre 6.0 y 7.0. ⁽¹¹⁾

3.3 PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS ESPECÍFICOS PARA ALGUNAS VACUNAS.

3.3.1 VACUNA ANTICOLERICA

Fuente material: Células serotipos ***Inaba y Ogawa***

Método producción: Inactivación.Sedimentación

Ensayo potencia: Prueba de protección 3+3

La vacuna anticolérica está constituida por una suspensión homogénea de vibriones coléricos (***Vibrio cholerae***) pertenecientes a una o varias cepas

apropiadas, y contiene un mínimo de 8×10^9 bacterias por dosis humana. El volumen que contiene esta dosis no debe ser superior a 1,0 ml.

ENSAYOS

ESTERILIDAD. La vacuna anticolérica debe satisfacer el ensayo de esterilidad.

TOXICIDAD ANORMAL. La vacuna anticolérica debe satisfacer el ensayo de toxicidad anormal de inmunosueros y vacunas para uso humano. Para llevarlo a cabo se inyectan 0,5 ml de vacuna por ratón y 1,0 ml por cobaya.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS. Se verifica la capacidad de la vacuna anticolérica para estimular la producción de anticuerpos tales como los anticuerpos aglutinantes, vibriocidas o hemaglutinantes en el cobaya, el conejo o el ratón. Se administra la vacuna al menos a un grupo de 6 animales. Se determina, basándose en experiencias preliminares, el intervalo de tiempo que permite obtener la respuesta de anticuerpos más elevada. Pasado este tiempo, se toma el suero de cada animal y se valora el título de anticuerpos por un método adecuado. La vacuna objeto de examen satisface el ensayo si cada serotipo provoca una respuesta significativa de producción de anticuerpos. (11)

3.3.2 VACUNA TOSFERINA

Fuente material: Células ***Bordetella pertussis***

Método producción: Inactivación formol. Sedimentación

Ensayo potencia: Prueba de protección 3+3

La vacuna contra la tosferina está constituida por una suspensión estéril de *Bordetella pertussis* inactivada o de fracciones de este microorganismo, en una disolución de cloruro sódico al 0,9 por ciento m/V o en otra disolución isotónica adecuada.

ENSAYOS

ESTERILIDAD. La vacuna debe satisfacer el ensayo de esterilidad.

TOXICIDAD ANORMAL. La vacuna debe satisfacer el ensayo de toxicidad anormal de los inmunosueros y vacunas para uso humano. En el ensayo en ratones, se inyecta subcutáneamente, a cada animal, 1,0 ml de vacuna.

POTENCIA. Prueba de protección 3+3

3.3.3 VACUNA FIEBRE TIFOIDEA

Fuente material: Células ***Salmonella typhi***

Método producción: Inactivación formol, fenol, acetona
sedimentación, resuspensión

Ensayo potencia: Inducción de Anticuerpos en conejos

La vacuna contra la fiebre tifoidea liofilizada es una preparación obtenida a partir de ***Salmonella typhi*** inactivada. La vacuna reconstituida según las indicaciones de la etiqueta se presenta bajo forma de una suspensión que contiene no menos 5×10^8 y no más 1×10^9 bacterias (***S. typhi***) por dosis humana. El volumen de esta dosis no debe exceder de 1,0 ml de la vacuna reconstituida.

ENSAYOS

FENOL. Si se utiliza fenol, su concentración no debe exceder del 0,5 % m/V.

ENSAYO POTENCIA: Inducción de anticuerpos en conejos.

PODER ANTIGENICO. Se inyecta la vacuna contra la fiebre tifoidea a animales de laboratorio sensibles. La vacuna debe estimular la formación de aglutininas anti-O, anti-H y, en menor cantidad anti-Vi.

ESTERILIDAD. Debe satisfacer el ensayo de esterilidad

TOXICIDAD ANORMAL. Debe satisfacer el ensayo de toxicidad anormal de inmunosueros y vacunas para uso humano. Se inyectan 0,5 ml de vacuna por ratón y 1,0 ml por cobayo.

3.3.4 VACUNA TUBERCULOSIS: BCG

Fuente material: Células BCG vivas

La vacuna BCG liofilizada es una preparación de bacterias vivas liofilizadas que proceden de un cultivo del ***bacilo de Calmette y Guérin***, para el que se haya demostrado su capacidad de proteger al hombre frente a la tuberculosis.

La vacuna liofilizada debe tener el aspecto de un polvo blanco o de un depósito en forma de costra. La preparación reconstituida, según las indicaciones de la etiqueta, tendrá la apariencia de una suspensión para administrar por vía intradérmica.

ENSAYOS

PRUEBA DE SEGURIDAD: MICOBACTERIAS VIRULENTAS

Se utilizan 6 cobayas de no más de 400 g de peso cada uno que no hayan recibido ningún tratamiento que pudiera falsear el resultado. Se inyecta por vía subcutánea, a cada cobaya, una cantidad de vacuna BCG liofilizada, reconstituida, según las indicaciones de la etiqueta, correspondiente a 50 dosis humanas por lo menos. Se mantienen los cobayas en observación durante al menos 42 días. Pasado este tiempo se sacrifican los animales e investigan por autopsia los signos clínicos de la tuberculosis, no teniéndose en cuenta una reacción mínima que puede aparecer en el punto de la inoculación.

Se examinan de igual modo los cobayas muertos durante el período de observación. La vacuna satisface el ensayo si ninguno de los cobayas presenta signos de tuberculosis y si no muere más de un animal durante el periodo de observación. Si dos o más animales mueren durante este periodo y la autopsia no revela ningún signo de tuberculosis, debe repetirse el ensayo en 6 nuevos cobayas.

La vacuna satisface el ensayo si no muere más de un animal del segundo grupo durante los 42 días siguientes a la inyección y en la autopsia no muestra ningún signo de tuberculosis.

PRUEBA DE ESTERILIDAD. La vacuna BCG liofilizada reconstituida debe satisfacer el ensayo de esterilidad excepto en lo que respecta a la presencia de micobacterias.

REACTIVIDAD CUTANEA EXCESIVA. Se inyecta por vía intradérmica a 4 cobayas sanos, blancos o de color claro, de 350 g de peso cada uno al menos y que no hayan recibido ningún tratamiento que pueda falsear el ensayo, 0.1 mL de la vacuna BCG liofilizada reconstituida y de dos diluciones decimales sucesivas, así como las mismas dosis de la vacuna de referencia. Se observan las lesiones formadas en los puntos de inyección durante 4 semanas.

La vacuna satisface el ensayo si la reacción producida no difiere de la producida por la vacuna de referencia.

3.3.5 VACUNA MENINGITIS

La vacuna antimeningocócica de polisacáridos está constituida por uno o varios polisacáridos purificados obtenidos a partir de cepas de *Neisseria meningitidis* pertenecientes a los serogrupos A, C, Y y W135 que hayan demostrado ser capaces de producir polisacáridos inofensivos, y capaces de inducir la producción de niveles satisfactorios de anticuerpos específicos en el hombre.

La vacuna debe ser estabilizada. Puede contener bien un único tipo de polisacárido o bien una mezcla de varios tipos.

ENSAYOS

ESTERILIDAD. La vacuna debe satisfacer el ensayo de esterilidad.

PIROGENOS. La vacuna debe satisfacer el ensayo de pirógenos. Para llevarlo a cabo se inyecta a cada conejo por kilogramo de masa corporal, una cantidad de vacuna correspondiente a 0,025 mg de cada polisacárido, en 1 ml.

TOXICIDAD ANORMAL. La vacuna debe cumplir el ensayo de toxicidad anormal de inmunosueros y vacunas de uso humano, modificado como se especifica a continuación: Se inyecta a cada cobaya una cantidad de vacuna correspondiente a 10 dosis humanas y se observa a los animales durante 7 días. Se inyecta a cada ratón una cantidad de vacuna correspondiente a 2 dosis humanas y se observa a los animales durante 7 días.

3.3.6 VACUNA RABIA

Esta vacuna es elaborada con una cepa aprobada de virus de rabia, activo, modificado, liofilizado o inactivado y presentado en forma líquida o liofilizada. Se produce a partir de cultivos celulares primarios o a partir de líneas celulares o en cerebros de ratones lactantes. Para cada lote de producto terminado deben realizarse las siguientes pruebas:

ENSAYOS

PRUEBA DE ESTERILIDAD. La vacuna debe satisfacer el ensayo de esterilidad.

PRUEBAS DE INACTIVACION VIRAL.

Utilizar:

- a) 10 ratones sanos y susceptibles a la rabia, de la misma cepa, de 21 días de edad y de 12 – 16 gramos de peso.
- b) 8 ratones lactantes sanos y susceptibles a la rabia, de 3 – 5 días de edad.
- c) 2 conejos sanos y susceptibles a la rabia, de 1.5 – 2.5 Kg de peso.

Todos los animales deben ser inoculados con la suspensión viral en estudio, por vía intracerebral: los ratones con 0.03 mL; los lactantes con 0.02 mL y los conejos con 0.25 mL. Observar a los animales diariamente durante 21 días post inoculación.

Colectar los cerebros de los animales que mueran entre el 4^o y 21^o día, se tratará de detectar el virus, inyectando 5 ratones por vía intracerebral con el material procedente de cada cerebro, observando así durante 30 días.

Para confirmar la presencia o ausencia del virus de la rabia se debe aplicar la prueba de anticuerpos fluorescentes.

PRUEBA DE SEGURIDAD

Esta debe realizarse en ratones y en cobayos, en caso de que la vacuna deba reconstituirse, se hará utilizando el diluyente que la acompaña, de acuerdo a las indicaciones del laboratorio productor.

a) Prueba en ratones adultos: utilizar 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 gramos de peso, sanos y susceptibles a la rabia, a cada uno inocularlo con 0.5 mL de la vacuna en estudio por vía intraperitoneal y se observan diariamente por 21 días. Para que la prueba se considere satisfactoria, todos los animales deben permanecer sanos, sin signos de enfermedad durante el período de prueba.

b) Prueba en Cobayos: utilizar 2 cobayos de 250 a 300 gramos de peso, sanos y susceptibles a la rabia, los cuales deben ser inculados por vía intraperitoneal con 2 mL del producto y deben ser observados diariamente durante 21 días. Para que la prueba se considere satisfactoria, todos los animales deben permanecer sanos, sin signos de enfermedad durante el período de prueba. ⁽¹¹⁾

3.3.7 VACUNA ANTIGRIPIAL INACTIVADA

La vacuna antigripal inactivada está constituida por una suspensión acuosa, estéril, de una o de varias cepas de virus de la gripe de los tipos A y B (I), solos o mezclados, inactivados de forma que conserven sus propiedades antigénicas.

Las cepas adecuadas contienen hemaglutinina y neuraminidasa. La vacuna debe contener la cantidad de hemaglutinina autorizada por las autoridades nacionales. La vacuna se presenta bajo la forma de un líquido ligeramente opalescente, u opalescente si se ha añadido un coadyuvante.

ENSAYOS

PRUEBAS DE SEGURIDAD

- INACTIVACIÓN: INOCULACIÓN DE EMBRIONES DE POLLO

Inactivación del virus. Se inyecta una dosis humana de vacuna en la cavidad alantoidea de al menos 10 huevos de gallina embrionados, de 10 a 13 días de edad, y se incuban a 33-37 °C durante 3 días. Al menos el 80 por ciento de los embriones de pollo deben sobrevivir. De cada huevo superviviente se recogen volúmenes iguales de líquido alantoideo, alrededor de 1 ml y se mezclan. Se inocula en cada uno de los 10 embriones 0,1 ml de este líquido y se incuban a 33-37 °C durante 3 días. No debe tener lugar multiplicación de los virus en el segundo lote de huevos embrionados, lo que se determina por una prueba de hemoaglutinación.

ESTERILIDAD. Debe satisfacer el ensayo de esterilidad.

TOXICIDAD ANORMAL. La vacuna debe satisfacer el ensayo de toxicidad anormal de inmunosueros y vacunas para uso humano.

3.3.8 INMUNOSUEROS PARA USO HUMANO

Los Inmunosueros para uso humano son preparaciones purificadas que contienen inmunoglobulinas obtenidas a partir de sueros de animales inmunizados. Las inmunoglobulinas tienen la capacidad de neutralizar específicamente venenos, toxinas formadas por bacterias, o de combinarse específicamente con bacterias, virus u otros antígenos.

Los inmunosueros se obtienen a partir de animales sanos que han sido inmunizados mediante inyección de las toxinas o toxoides adecuados, venenos, suspensiones de microorganismos u otros antígenos.

ENSAYO

ESTERILIDAD. Deben satisfacer el ensayo de esterilidad.

TOXICIDAD ANORMAL. Debe satisfacer las normas del ensayo de toxicidad anormal para inmunosueros y vacunas de uso humano.

3.3.8.1 INMUNOSUERO BOTULINICO

ANTITOXINA BOTULÍNICA

La antitoxina botulínica es una preparación que contiene globulinas antitóxicas capaces de neutralizar específicamente las toxinas producidas por ***Clostridium botulinum*** tipo A, tipo B o tipo E, o cualquier mezcla de estos tipos. Se obtiene mediante fraccionamiento a partir de suero de caballos, u otros mamíferos, que hayan sido previamente inmunizados con toxinas de ***Cl. botulinum*** de tipo A, tipo B y tipo E.

ENSAYOS

ESTERILIDAD. Deben satisfacer el ensayo de esterilidad.

TOXICIDAD ANORMAL. Debe satisfacer las normas del ensayo de toxicidad anormal para inmunosueros y vacunas de uso humano.

3.3.8.2 INMUNOSUERO DIFTERICO

Antitoxina Diftérica

La antitoxina diftérica es una preparación que contiene globulinas antitóxicas capaces de neutralizar específicamente la toxina producida por ***Corynebacterium diphtheriae***. Se obtiene mediante fraccionamiento de suero de caballos, u otros mamíferos, que hayan sido previamente inmunizados contra la toxina diftérica.

ENSAYOS

ESTERILIDAD. Deben satisfacer el ensayo de esterilidad.

TOXICIDAD ANORMAL. Debe satisfacer las normas del ensayo de toxicidad anormal para inmunosueros y vacunas de uso humano.

3.3.8.3 INMUNOSUERO TETANICO

ANTITOXINA TETÁNICA PARA USO HUMANO

La antitoxina tetánica para uso humano es una preparación de globulinas antitóxicas capaces de neutralizar específicamente la toxina producida por ***Clostridium tetani***. Se obtiene mediante fraccionamiento a partir de suero de caballo, o de otros mamíferos inmunizados frente a la toxina tetánica.

ENSAYOS

ESTERILIDAD. Deben satisfacer el ensayo de esterilidad.

TOXICIDAD ANORMAL. Debe satisfacer las normas del ensayo de toxicidad anormal para inmunosueros y vacunas de uso humano.

3.3.9 INMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL

La inmunoglobulina humana normal es una preparación líquida o liofilizada, que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G (Ig G). Pueden estar también presentes otras proteínas. La preparación se administra por vía intramuscular. Se obtiene a partir de plasma, suero o placentas normales, congeladas inmediatamente tras su obtención.

ENSAYOS

ESTERILIDAD. La muestra debe satisfacer el ensayo de esterilidad.

PIRÓGENOS. La muestra debe satisfacer el ensayo para pirógenos. Se debe inyectar en cada conejo 1 ml de la muestra por Kg de masa corporal.

TOXICIDAD ANORMAL. La muestra debe satisfacer el ensayo de toxicidad anormal de inmunosueros y vacunas para su uso humano. Se inyectan 0,5 ml de la muestra en cada ratón y 5 ml en cada cobaya. (11)

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

La investigación se realizó por medio de un estudio prospectivo, bibliográfico.

4.1.1 ESTUDIO PROSPECTIVO

Se recopiló toda la información necesaria para la elaboración del manual de procedimientos microbiológicos para inyectables y vacunas y otros temas relacionados. Este podrá ser utilizado en el futuro como una guía para la elaboración de nuevos manuales y además empleado en la docencia y en laboratorios de análisis microbiológico.

4.1.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Esta investigación se llevó a cabo recopilando la información teórica relacionada con los métodos de análisis microbiológicos de medicamentos inyectables y vacunas, información para la elaboración de manuales; para lo cual fue necesario consultar la norma ISO/IEC 17025 de la cual se tomó el formato para elaborar los procedimientos de análisis. (Ver anexo 1).

El formato del manual reúne toda la información necesaria para realizar el procedimiento analítico de acuerdo al tipo de muestra a ensayar, ya sean sólidas, líquidas o con características específicas.

Se recopiló además información sobre el mantenimiento de las áreas asépticas, monitoreo de las mismas, normas para el personal que labora en estas áreas, manejo de medios de cultivo y material de vidrio y diseño estructural de un laboratorio de microbiología.

La bibliografía consultada se obtuvo de diferentes fuentes:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Laboratorios Farmacéutica Rodim, S.A. de C.V.
- Internet.

.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

En la investigación de campo se realizaron entrevistas en dos laboratorios nacionales fabricantes de medicamentos inyectables, con el fin de realizar un diagnóstico de las normas que establecen los procedimientos para los análisis microbiológicos de este tipo de medicamentos.

UNIVERSO Y MUESTRA

Para establecer el número de laboratorios a visitar se partió de un universo de 8 laboratorios fabricantes de medicamentos inyectables a nivel nacional y por medio de cálculos estadísticos empleando la fórmula de Sturges se estableció el tamaño de la muestra: 25 % del universo es decir 2 laboratorios.

(Ver anexo 2)

OBTENCION Y ANALISIS DE RESULTADOS

El instrumento empleado para la recopilación de datos fue una entrevista dirigida al personal encargado de realizar los análisis microbiológicos a los medicamentos inyectables producidos en los laboratorios. (Ver anexo 3)

Las empresas visitadas fueron Laboratorios Ancalmo Internacional y Laboratorios Pharmedic, los cuales se identificaron con letras para proteger la identidad de éstos (ver anexo 4).

No se permitió el acceso a las áreas de análisis, únicamente se realizó la entrevista al personal encargado. Como limitante en la investigación se menciona que en general lo laboratorios no brindan información específica sobre sus procedimientos debido a sus políticas de confidencialidad.

Las respuestas obtenidas en ambos laboratorios fueron comparadas y se establecieron las similitudes entre ellas, encontrándose que coinciden en un 70% de estas, por lo cual se estableció que los laboratorios visitados realizan sus procedimientos en forma similar y basándose en los libros oficiales, así como en las normas establecidas por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

CAPITULO V
RESULTADOS

**5.1 DIAGNOSTICO SOBRE LAS NORMAS QUE RIGEN LOS ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICOS DE LOS MEDICAMENTOS INYECTABLES EN
LOS LABORATORIOS FABRICANTES EN EL SALVADOR.**

5.1 DIAGNOSTICO SOBRE LAS NORMAS QUE RIGEN LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LOS MEDICAMENTOS INYECTABLES EN LOS LABORATORIOS FABRICANTES EN EL SALVADOR

Para llevar a cabo la presente investigación y obtener la información necesaria con respecto a las normas oficiales que se aplican en los laboratorios nacionales que fabrican productos inyectables, fue necesario elaborar una serie de preguntas recopiladas en un instrumento que permite efectuar una entrevista a los profesionales encargados de realizar análisis microbiológicos de medicamentos parenterales en dos laboratorios. (Ver anexo 4)

Por medio de la entrevista pudo recopilarse la información necesaria para efectuar un diagnóstico de las normas que rigen los análisis microbiológicos en dichos laboratorios.

A continuación se presentan los resultados de dicha entrevista:

1. ¿Cuales son los libros oficiales que establecen las normas para realizar los procedimientos de análisis microbiológico de los medicamentos inyectables?

A	Farmacopea de los Estados Unidos USP 25, Farmacopea Británica.
P	Farmacopea de los Estados Unidos USP 24.

Los laboratorios generalmente se rigen bajo las normas dictaminadas por la Farmacopea de los Estados Unidos, Farmacopea Británica y otras. En algunos casos no les es posible adquirir las ediciones más recientes de las farmacopeas debido a su costo.

El empleo de estas normas es con el objetivo de ofrecer productos con los más altos estándares de calidad, que cumplan con los requisitos dictaminados por el Consejo Superior de Salud Pública y a su vez que sean aceptados tanto por el mercado nacional como internacional.

2. ¿Cuántas personas se encargan de realizar los análisis microbiológicos?

A	Un analista
P	Un analista

En los laboratorios hay dos o más personas capacitadas para realizar los análisis, sin embargo, durante una jornada de trabajo sólo se permite el ingreso de una persona al área limpia, con el fin de minimizar las probabilidades de contaminación tanto del área como de las muestras.

3. ¿Existe un programa de capacitación para el personal?

A	Si.
P	Si.

Los programas de capacitación son fundamentales para la buena ejecución y documentación de los análisis. Estas capacitaciones pueden ser internas, como las impartidas por el departamento de GMP, o externas como cursos, seminarios, capacitaciones, diplomados y otros impartidos por organizaciones afines. Es importante que el personal tenga conocimientos actualizados acerca de las nuevas tecnologías para el análisis y así escoger aquellas que mejor se acoplen a las necesidades particulares de cada empresa.

4. ¿Se tiene un programa de control médico?, ¿cada cuanto tiempo se realiza?

A	Si, cada 6 meses.
P	Si, cada 6 meses.

El programa de control médico se realiza con el fin de mantener la buena salud del personal, éste incluye exámenes generales (heces, orina, sangre y pulmón), consulta médica e inmunización por medio de vacunas. Si por alguna razón un analista presenta problemas de salud lo notifica inmediatamente a su jefe inmediato; ya que no se permite el ingreso a las áreas limpias si éste presenta heridas, daños en la piel o infecciones de cualquier tipo.

5. ¿Que requisitos debe cumplir el personal para ingresar al área de análisis microbiológicos?

A	Capacitado, buena disciplina y buena salud.
P	Capacitado, buena salud

El personal debe estar debidamente capacitado, es decir, debe conocer perfectamente el procedimiento que va a realizar, la forma adecuada de hacerlo y tener en cuenta todas las normas a seguir dentro de un área limpia. Todas las actividades que se realizan previo al ingreso y dentro del área limpia están debidamente plasmadas en un procedimiento normalizado de operación el cual deberá seguirse estrictamente para asegurar buenos resultados en los análisis.

6. ¿Qué tipo de controles se le realizan a los medios de cultivo y material de vidrio?

A	<p>Cuando un medio se prepara a partir de un frasco de medio deshidratado nuevo se le hacen pruebas de pH, y promoción de crecimiento. Cuando se preparan medios para el uso de rutina se hacen pruebas de esterilidad dejando un control negativo para cada análisis que se realiza.</p> <p>En cuanto al material de vidrio únicamente se verifica la integridad de éste y la esterilidad a través de cinta testigo.</p>
P	A los medios de cultivo se les verifica pH y esterilidad, para el material de vidrio se revisa la integridad, la esterilidad se determina por medio de cinta testigo.

Cada laboratorio tiene procedimientos estandarizados para la preparación de los medios de cultivo y la limpieza y esterilización del material de vidrio, estos procedimientos ya han sido comprobados en su eficacia y por lo tanto no consideran necesario realizar todas las pruebas a cada lote de medios o de cristalería, únicamente aquellas consideradas las más críticas para cada caso.

7. ¿Que condiciones debe reunir el área limpia antes de proceder a realizar los análisis microbiológicos?

A	El área debe tener condiciones de esterilidad tanto en aire como en superficies, temperatura entre 20 ^o -22 ^o C y humedad relativa inferior al 50 %.
P	El área debe tener condiciones de esterilidad tanto en aire como en superficies, temperatura entre 20 ^o -22 ^o C y humedad relativa inferior al 50 %.

El mantenimiento de las áreas limpias es de suma importancia para obtener resultados confiables en los análisis, cada laboratorio posee un programa de monitoreo ambiental, este se realiza antes y durante las actividades en el área limpia, siendo constantes las condiciones de temperatura y humedad con el fin de disminuir la probabilidad de crecimiento microbiano.

8. ¿Qué tipo de pruebas microbiológicas se realizan a los inyectables?

A	Esterilidad y pirógenos.
P	Esterilidad, la prueba de pirógenos es hecha en un laboratorio externo.

Cada lote de medicamentos analizado debe cumplir con las pruebas de esterilidad y pirógenos antes de ser liberado para su comercialización. Cuando un laboratorio no cuenta con los medios adecuados para realizar alguna de las pruebas, las muestra son enviadas a un laboratorio externo para su análisis.

Estas pruebas son consideradas críticas para los inyectables, ya que la contaminación microbiana inoculada junto con el medicamento puede ser mortal para el paciente.

9. ¿Cuáles son los métodos empleados para determinar la esterilidad y la presencia de pirógenos en las muestras?

A	Esterilidad: Filtración por membrana. Pirógenos: LAL.
P	Esterilidad: Filtración por membrana.

Cada laboratorio realiza sus procedimientos basado en la efectividad de éstos y en el costo. La prueba de filtración por membrana es efectiva y se emplean menos recursos para el análisis.

En el caso de la prueba de pirógenos por el método LAL, esta es más rápida, efectiva y menos costosa que las pruebas biológicas.

10. ¿Qué acciones se toman al obtener resultados inconformes en la esterilidad del producto?

A	Se hace una verificación de los registros del monitoreo ambiental para descartar contaminación procedente del aire y superficies. Proceden a realizar una limpieza completa del área, se repite el monitoreo ambiental y las pruebas de esterilidad a los medios y cristalería, finalmente se repite el análisis con el doble de muestra. Si los resultados son negativos, se invalida el primer resultado y el producto pasa prueba. Si el resultado es positivo el lote de medicamentos es rechazado y se procede a su destrucción.
P	Se hace una limpieza completa del área limpia, realizan monitoreo ambiental y se repite el análisis con el doble de muestra. Si los resultados son negativos, se invalida el primer resultado y el producto pasa prueba. Si el resultado es positivo el lote de medicamentos es rechazado y se procede a su destrucción.

Cuando un medicamento presenta contaminación microbiana, deberá someterse a un segundo análisis con el fin de descartar un resultado falso – positivo debido a contaminación externa, es importante destacar que si un lote sale contaminado en el segundo análisis, este ya no podrá ser reprocesado sino que deberá procederse a su destrucción.

**5.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS NORMAS DE TRABAJO PARA EL
PERSONAL EN UN ÁREA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE
MEDICAMENTOS ESTÉRILES.**

5.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS NORMAS DE TRABAJO PARA EL PERSONAL EN UN AREA DE ANALISIS MICROBIOLOGICO DE MEDICAMENTOS ESTERILES.

En la industria farmacéutica se ha establecido que los procedimientos de análisis físicos, químicos y microbiológicos deben ser realizados siguiendo los principios básicos de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

El personal asignado a estas áreas debe seguir estrictamente las normas, para ello es necesario que este reciba un entrenamiento y capacitación adecuados para garantizar que los resultados obtenidos son confiables y que los productos son seguros para el paciente.

5.2.1 ENTRENAMIENTO DE PERSONAL

El conocimiento de las políticas regulatorias y de las responsabilidades de cada individuo con respecto a las Buenas Prácticas de Laboratorio debe ser una parte integral del programa de capacitación interna.

El entrenamiento del personal encargado de trabajar en las áreas con ambiente controlado es crítico y es igualmente importante para los que realizan el programa de monitoreo ambiental, donde la contaminación puede ocurrir inadvertidamente durante un procedimiento.

Dicha capacitación debe incluir instrucciones sobre los principios básicos de microbiología, fisiología microbiana, desinfección y sanitización, selección y preparación de medios, procedimientos para esterilización y métodos de

laboratorio. Deben realizarse evaluaciones periódicas para asegurar que el conocimiento y destrezas adquiridas son satisfactorios. (6)

El personal seleccionado para trabajar en el análisis microbiológico y fabricación de un producto parenteral debe ser: ordenado y confiable ya que éste ofrece el mayor peligro de contaminación a los cuartos limpios y a los productos estériles debido a los microorganismos y partículas no vivientes que esparce, es por ello que el personal debe ser saludable y estar libre de afecciones dermatológicas que pudieran aumentar la carga microbiana. (10)

5.2.2 NORMAS GENERALES PARA EL PERSONAL EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- El personal deberá darse un baño diario, cepillarse los dientes, mantener las uñas cortas, limpias y sin esmalte, no se permite el uso de perfume o desodorantes perfumados, cosméticos, joyería; se prohíbe además el ingreso de objetos ajenos a los procedimientos asépticos.
- Se prohíbe el comer, beber o fumar dentro de las instalaciones del laboratorio.

5.2.3 NORMAS ESPECIFICAS PARA EL PERSONAL QUE INGRESA A LAS ÁREAS LIMPIAS.

Las personas que accedan a las áreas limpias cumplirán las siguientes medidas que serán supervisadas desde el exterior por el personal designado:

- No se admitirá el ingreso a las áreas limpias de personal que presente enfermedades infectocontagiosas, lesiones abiertas o cualquier otro problema de salud que pueda ser causa de contaminación; además deberá someterse a un control médico por lo menos dos veces al año.
- En las áreas limpias sólo estará presente el número mínimo de personal, especialmente durante el proceso aséptico.
- El ingreso al área limpia se realizará a través de exclusas las cuales son áreas en donde existe presión positiva del aire, de manera que al abrir las puertas no penetre el aire sin filtrar. Este acceso se lleva a cabo siguiendo un procedimiento establecido. (10)

Se detalla a continuación un ejemplo de este:

- En la primera exclusiva se quita la ropa de calle, se retiran el maquillaje y joyería.
- Se pasa luego a una ducha en donde se dará un baño completo, deben lavarse rigurosamente las manos y antebrazos hasta el codo, las uñas deben limpiarse con un cepillo adecuado. El secado se hará usando un secador, toallas u otro dispositivo que evite el desprendimiento de mota. Finalmente debe aplicarse desinfectante en las manos.
- Pasar a una tercera exclusiva en donde se colocará el vestuario adecuado al proceso a realizar y al tipo de área de trabajo:

Se usarán trajes de una pieza, cerrados en las muñecas y con cuello alto, y calzados o cubre calzados adecuados.

La parte inferior de los pantalones se introducirá dentro del calzado y las mangas dentro de los guantes. El cabello, y cuando corresponda la barba y/o bigote quedarán cubiertos por un tocado (verdugo) que se introducirá en el cuello del traje. Esta ropa no liberará virtualmente fibra o partícula alguna. La misma se proveerá esterilizada. Al colocarse los guantes sólo se manipularán los objetos y materiales requeridos para el proceso que se está efectuando, en caso contrario se procederá al cambio de guantes.

- Luego se procede a ingresar al área.
- Los materiales que se ingresan al área de trabajo deben ser previamente esterilizados, transportándolos en carretillas; las cuales no deben sobrepasar la línea de demarcación de las exclusas. Deberá tenerse una carretilla en el área estéril la cual no deberá salir de la misma.
- Los materiales a utilizarse en el área estéril no deben desprender mota.
- Los movimientos del personal dentro de las áreas deben ser lentos, se prohíbe por lo tanto cualquier tipo de movimiento que cause agitación de aire.
- La salida eventual de personal de los cuartos limpios sólo se autorizará en los casos absolutamente imprescindibles. (10)

5.2.4 VESTUARIO

El vestuario que el personal utiliza en las áreas limpias es de suma importancia; éste debe reunir ciertas características:

- a) Deberá tener un mínimo de costuras, deben estar firmemente cubiertas por la raíz del borde del material.
- b) Ausencia de bolsillos, cinturones y áreas plegadas o apiladas.
- c) La tela debe ser fuerte de modo que no se rompa con facilidad.
- d) La ropa protectora no liberará partícula alguna y retendrá las emitidas por el cuerpo.
- e) Las hebras de costura deben ser de material monofilamento.

Se proveerá para todo el personal empleado del área la ropa protectora limpia y esterilizada.

La limpieza de las ropas utilizadas en las áreas limpias se efectuará de tal forma que no se le adhieran partículas contaminantes que posteriormente puedan desprenderse de las mismas. Es conveniente contar con instalaciones separadas para dichas ropas. Si las ropas se deterioran debido a la limpieza o lavado inadecuado, puede aumentar el riesgo de que de ellas se desprendan partículas. Las operaciones de lavado, higienización y/o esterilización se efectuarán de conformidad con procedimientos de eficacia conocida. (10)

5.3 DETALLE DE LOS PROCEDIMIENTOS PARA MONITOREO AMBIENTAL DE AREAS ESTÉRILES Y METODOS DE CONTROL PARA MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIAL DE VIDRIO USADOS PARA EL ANALISIS MICROBIOLOGICO DE INYECTABLES Y VACUNAS.

5.3 DETALLE DE LOS PROCEDIMIENTOS PARA MONITOREO AMBIENTAL DE AREAS ESTERILES Y METODOS DE CONTROL PARA MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIAL DE VIDRIO USADOS PARA EL ANALISIS MICROBIOLOGICO DE INYECTABLES Y VACUNAS.

Para el análisis microbiológico de medicamentos estériles es de suma importancia garantizar que los resultados que se obtienen no sean alterados por factores ajenos a la muestra, para ello es necesario realizar controles específicos para las áreas donde se realizan así como para todos los utensilios y medios de cultivo empleados durante los análisis, a continuación se detallan dichos controles.

5.3.1 MONITOREO AMBIENTAL DE ÁREAS ESTERILES

La flora microbiana del aire es transitoria y variable. El número y tipo de microorganismos en el aire esta determinado por las fuentes de contaminación del ambiente, como los microorganismos que son expelidos del aparato respiratorio al hablar, toser o estornudar y las partículas de polvo que circulan al ser levantadas del suelo y otras superficies por las corrientes de aire.

En las áreas limpias, el aire así como el personal que labora pueden ser las principales fuentes de contaminación debido a los microorganismos y a las partículas no vivientes que éstos esparcen. El control ambiental nos ofrece una garantía razonable que el medio ambiente no es una fuente de contaminación para la muestra. Los programas de monitoreo microbiológico de las áreas limpias nos permiten asegurar la efectividad de los procesos de limpieza y

sanitización y además establecer que el ambiente está operando bajo un estado adecuado de control.

Para llevar a cabo un control microbiológico adecuado y que se obtengan datos confiables es necesario establecer procedimientos normalizados de operación tal como lo indican las Buenas Prácticas de Laboratorio. El ambiente puede ser monitoreado en diferentes situaciones: cuando los materiales a utilizar se encuentran en el área, mientras se realizan los procedimientos o cuando todo el personal involucrado esté realizando sus ocupaciones, así se obtienen datos significativos. ⁽⁵⁾

Los métodos más comúnmente usados para el monitoreo ambiental son de dos tipos:

- a) Método de muestreo del aire.
- b) Método de muestreo de superficies.

En primer término se debe considerar que éstos métodos tienen como principio, establecer mediante recuento la ausencia de bacterias, hongos filamentosos y levaduras, sobre todo los llamados microorganismos patógenos (*Pseudomona aureaginosa*, *E. coli*, *Salmonella* y *St. aureus*). ⁽⁹⁾

5.3.2 MUESTREO DEL AIRE

El mantenimiento de las condiciones de esterilidad en las áreas destinadas al análisis microbiológico de medicamentos parenterales y vacunas es esencial para asegurar que las muestras no sufran una contaminación accidental y se obtengan datos falso – positivos.

Para mantener estas condiciones de esterilidad bajo control es necesario realizar un programa de monitoreo del aire que garantice datos significativos, este programa se realiza mediante la medición de partículas viables y no viables (recuento total de partículas).

El recuento de partículas viables indica la cantidad de microorganismos presentes en el área y normalmente se reportan como Unidades Formadoras de Colonias (UFC), este recuento no distingue entre un solo microorganismo y una colonia.

El recuento total de partículas se realiza generalmente por medio de instrumentos electrónicos que ofrecen resultados instantáneamente, basados en la medición de la cantidad de partículas en un volumen establecido de aire. La obtención de datos en forma inmediata permite detectar cualquier falla en el sistema de filtración de aire o en los programas de mantenimiento ambiental.

La clasificación de las áreas limpias está basada en éstas mediciones. ⁽⁸⁾

(Ver Anexo # 6)

5.3.2.1 PROGRAMA DE MONITOREO DEL AIRE

Un programa de monitoreo esta basado en el uso de diferentes métodos para recolectar una muestra microbiológica del medio ambiente usando un medio de cultivo nutritivo, generalmente sólido; luego se incuba a una temperatura previamente establecida por un período de tiempo determinado, lo cual permite el crecimiento y multiplicación de los microorganismos recolectados en la superficie del medio. El recuento de estas colonias

expresado en UFC es un indicador de la contaminación microbiana del ambiente en el momento y bajo las condiciones de muestreo.

Hay dos tipos de monitoreo: monitoreo dinámico y monitoreo estático. El monitoreo dinámico es el muestreo que se realiza durante el periodo de trabajo y permite determinar los efectos de la presencia y los movimientos del operador en la calidad microbiológica del aire.

El monitoreo estático se realiza cuando el área limpia se encuentra en reposo y permite evaluar los procedimientos de limpieza, el funcionamiento de las instalaciones y de los equipos que mantienen las condiciones ambientales, tales como filtros de aire, lámparas UV, etc.

El muestreo debe realizarse en sitios estratégicos de manera que los resultados reflejen las condiciones ambientales del área. La determinación de los sitios más adecuados para el monitoreo se hace llevando a cabo múltiples muestreos en diferentes puntos del área, deben realizarse cada día en un período de una a dos semanas. Los datos obtenidos se evalúan y se determinan los puntos de muestreo que reflejan datos más significativos, esto permite establecer una línea base del número de colonias de microorganismos presentes y posteriormente detectar incrementos anormales en el número de UFC para realizar la investigación y determinar si alguno de los procedimientos de mantenimiento del área está fallando. La frecuencia del muestreo dependerá del tipo de área: para áreas clase 100 y las áreas de soporte inmediatamente adyacentes a esta (por ejemplo áreas clase 10,000) el muestreo se realiza en

cada cambio de operación. Para otras áreas de soporte (clase 100,000) se hace dos veces por semana, y para otras áreas de soporte para los procedimientos asépticos pero en las cuales no está expuesto el producto (clase 100,000 o inferior) se realiza un vez por semana. (8)

5.3.2.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AIRE

Los métodos para determinar la contaminación microbiológica del aire han sido clasificados como:

- Muestreo Pasivo
- Muestreo activo

MUESTREO PASIVO: éste es el más usado y consiste en la exposición de placas de 100 mm de diámetro conteniendo un medio nutritivo sólido en puntos estratégicos por un período de tiempo determinado, generalmente de 1 a 3 horas, tanto en condiciones estáticas como dinámicas. Las placas son incubadas posteriormente a 37 °C por 48 horas, luego se realiza el conteo de las colonias. Algunos de los medios de cultivo mas utilizados son: Tripticasa Soya agar (TSA), agar Sangre y agar Estándar Método.

MUESTREO ACTIVO: éste consiste en el empleo de un mecanismo especial que permite atraer un volumen de aire y atrapar los microorganismos que se hallan en él.

Existen 3 tipos de muestreadores pasivos:

- Golpeador Líquido

Consiste en la aspersion del aire que pasa a través de un orificio capilar. Los microorganismos que son arrastrados son golpeados a alta velocidad con el líquido. Al terminar el período de muestreo, el líquido se somete a una filtración por membrana, el papel filtro se coloca sobre agar y se incuba, realizándose posteriormente el conteo.

El grado de contaminación se determina dividiendo el número de colonias entre el volumen de aire muestreado. El volumen de aire muestreado se determina conociendo en tiempo de muestreo y la velocidad de flujo del aire al pasar por el orificio. ⁽⁵⁾

- Filtración por Membrana

Consiste en hacer pasar cierta cantidad de aire por un filtro de membrana, el filtro se coloca en agar, se incuba la placa y se procede al recuento de colonias. El volumen de aire se determina de la misma forma que el método anterior.

- Impacto en Agar

Es la técnica más utilizada para monitorear el ambiente. Existen 3 tipos de muestreadores:

a) Muestreador en Agar por Ranura:

Consiste en hacer pasar el aire por vacío a través de unas ranuras, usualmente a una velocidad de 1 pie cúbico por minuto (28 litros de aire por minuto).

Los microorganismos que arrastre el aire chocan con una placa con agar que está rotando a una velocidad constante bajo las ranuras. Este es un método cuantitativo, el cual relaciona concentración con volumen en un tiempo y velocidad de flujo conocida; su desventaja es que requiere vacío y fuentes de electricidad además del tamaño del aparato.

b) Muestreador por Tamizado:

Este consiste en que las partículas ambientales impactan con el agar. El aire pasa por vacío a través de un medidor de flujo hacia un muestreador, a una velocidad controlada. Este método es cuantitativo y proporciona una relación entre concentración y tiempo, además indica el tamaño de las partículas muestreadas. Este muestreador requiere vacío, pero no necesita fuente de energía.

c) Muestreador de Aire por Centrifugación:

Es manual y funciona con baterías, por lo que presenta la ventaja de ser portátil y muy conveniente, no requiere de vacío ni de una fuente de poder externa. Consiste en hacer pasar aire a través de espas rotatorias para que las partículas que se encuentran en el aire impacten con el agar por la fuerza centrífuga que generan las espas, luego se incuba y se procede al recuento.

5.3.3 MUESTREO DE SUPERFICIES

La necesidad de mantener en estado higiénico las superficies con las que entran en contacto las muestras estériles (inyectables y vacunas) tiene una importancia evidente para obtener resultados confiables.

Las superficies de contacto y los utensilios son muchas veces los focos de contaminación, donde pueden quedar retenidos gran cantidad de microorganismos que van a pasar a las muestras estériles durante el análisis. Esto conduce a la necesidad de desarrollar técnicas que permitan evaluar de forma adecuada el estado microbiológico de las superficies.

El control microbiológico de superficies se puede realizar en tres momentos: en el área limpia antes del comienzo de las actividades, en el área ya cargada microbiológicamente después de haber realizado los procedimientos y finalmente en el área en reposo después de realizada la limpieza.

Algunos de los métodos más usados en la valoración higiénica de superficies son:

5.3.3.1 MÉTODO DE TORUNDA:

Es el método más antiguo. Se utilizan torundas estériles de algodón o de alginato cálcico, humedecidas con solución salina estéril, estas se frotran sobre la superficie a evaluar. La torunda expuesta se puede sembrar directamente sobre una placa con medio adecuado o introducirse en un diluyente adecuado para liberar los microorganismos recogidos y luego sembrar alícuotas o diluciones de ése diluyente en placas de recuento.

Si se desea examinar determinadas zonas de una superficie, se pueden preparar plantillas con aberturas que correspondan con la extensión de la superficie a examinar, por ejemplo: 1 cm cuadrado, lo cual permite obtener el número de UFC por cm cuadrado. Se pueden utilizar una gama de medios de

cultivos selectivos y diferenciales para investigar concretamente los grupos de microorganismos.

5.3.3.2 MÉTODO DE PLACA DE CONTACTO O PLACA RODAC:

Consiste en hacer que el agar entre en contacto directo con los microorganismos que se encuentran en las superficies. Se emplean placas de petri especiales en las que se vierten entre 15.5 y 16.5 ml de un medio de cultivo determinado, obteniéndose así, una superficie de agar que sobresale del borde de la placa. Cuando se invierte la placa, el agar entra en contacto directamente con la superficie que se examina, después las placa se tapan, se incuban y se cuentan las colonias.

5.3.3.3 MÉTODO DE LAMINOCULTIVO:

Son sistemas diseñados especialmente para la determinación cuantitativa y cualitativa de superficies. Constan de unas tiras rectangulares de plástico, en donde va depositado un medio de cultivo, de forma similar a una placa petri de contacto, pero rectangular. Este medio de cultivo se pone en contacto con la superficie a examina, se incuba y se hace el recuento. ⁽³⁾ (Ver Anexo # 7).

En general los medios de cultivo mas usados en las pruebas para superficie son: agar estándar método, agar rojo violeta – bilis y caldo nutritivo.

5.3.4 METODOS PARA CONTROLAR LA POBLACION MICROBIOLOGICA DE LAS ÁREAS LIMPIAS.

Las áreas de procesamiento aséptico, como su nombre lo indica son un lugar de trabajo controlado y aislado del ambiente circundante, las mismas son construidas de tal forma que minimicen la posibilidad de contaminación. Estas áreas son controladas con el empleo de diferentes medidas, tales como el uso de filtros de alta eficiencia (HEPA) para partículas de aire, flujos laminares, ropa para cuartos limpios, procedimientos eficaces de limpieza e higienización, etc.

Es de suma importancia controlar la población microbiana en estas áreas; los métodos empleados dependen del tipo y clase de área y pueden aplicarse métodos físicos o agentes químicos.

Métodos Físicos:

- Radiaciones Ultravioleta.
- Sistemas para Aire Filtrado.

Agentes Químicos:

- Compuestos Químicos Inorgánicos.
- Compuestos Químicos Orgánicos. ⁽⁶⁾

5.3.4.1 METODOS FISICOS

RADIACIONES ULTRAVIOLETA

Los rayos ultravioleta poseen acción antimicrobiana, debido a que las radiaciones son absorbidas por las proteínas y los ácidos nucleicos, provocando

reacciones químicas dentro de los núcleos y otros componentes de la célula microbiana; de esta forma ejercen su efecto desinfectante sobre las superficies irradiadas directamente.

Actualmente se cuenta con lámparas que emiten radiaciones en la región de 250 a 270 nm, que es la zona bactericida más efectiva. Estos rayos no pueden penetrar en la mayoría de los materiales, debido a esto sólo se produce un efecto superficial. Los rayos UV se propagan en línea recta, por lo que los objetos situados en la trayectoria del haz de luz generan sombra, con la consiguiente falta de irradiación en las áreas sombreadas. Esto nos indica entonces que las lámparas deben ser instaladas en puntos estratégicos para que el aire y superficies hagan contacto con las radiaciones intensas.

El ojo humano y en menor grado la piel, se irritan fácilmente por la acción de estos rayos, se deben tomar precauciones para prevenir el daño en las personas que realicen actividades en áreas donde se encuentran instaladas las lámparas UV.

La aplicación de las radiaciones UV para desinfectar áreas puede ser de tres formas:

- Irradiación Directa: puede llevarse a cabo en áreas desocupadas u ocupadas por cortos lapsos. El personal deberá estar debidamente protegido (todo el cuerpo, incluyendo cabeza, cuello, cara y ojos). Este tratamiento es aplicable en áreas asépticas donde se manipulan medicamentos estériles, dejándose encendidas las lámparas cuando el área no se esté usando.

- Irradiación Indirecta: es aplicable en áreas ocupadas, donde el personal deberá ser protegido de las radiaciones.
- Irradiación en los sistemas de ventilación. (9)

SISTEMAS PARA AIRE FILTRADO

Los filtros para aire generalmente están hechos de algodón, vidrio u otros materiales fibrosos. Su eficacia bacteriológica depende de:

- El tiempo que tarda el aire en pasar por el filtro
- El tamaño de las partículas filtradas.
- La naturaleza del material con que se construyó el filtro; así como el espesor y lo compacto.

El aire se hace pasar a través de varios de estos filtros al espacio cerrado, de manera que toda la masa de aire se mueve con velocidad uniforme a lo largo de las líneas de flujo. Este sistema se está usando en gran variedad de diseños tanto verticales como horizontales, para limpiar habitaciones, cabinas y campanas para siembras estériles o de seguridad.

El aire del exterior pasa por un prefiltro de lana de vidrio, tela o plástico desmenuzado que elimina las partículas grandes. Luego el aire se trata pasándolo a través de un precipitado electrostático, induciendo cargas electrostáticas en las partículas de aire y las elimina por atracción hacia las placas con carga opuesta.

El aire pasa después por el dispositivo de limpieza mas eficiente, un filtro HEPA, con un mínimo de un 99.7 % de eficacia en la remoción de partículas de 0.3 μm . (Ver anexo 8)

5.3.4.2 AGENTES QUIMICOS

Son muchas las sustancias químicas que tienen efectos nocivos sobre los microorganismos; su actividad sobre estos es de dos tipos: unas destruyen las bacterias, hongos y virus y son agentes los bactericidas, fungicidas o viricidas. Otras dificultan o inhiben su crecimiento y son los bacteriostáticos, fungistáticos o virustáticos. Toda sustancia tiene un efecto estimulante a concentraciones mínimas sobre el crecimiento bacteriano; a mayores concentraciones es bacteriostática y a más altas, bactericida.

Una sustancia destinada a la desinfección del aire o superficies debe reunir una serie de condiciones para ser seleccionada:

- Alta actividad germicida aún diluido y a un precio accesible.
- Que su espectro de acción sea amplio y abarque las bacterias Grampositivas y Gramnegativas.
- Ser bactericida, mejor que bacteriostático; es decir, que mate a las bacterias en un tiempo corto, no mayor a 15 minutos.
- Ser estable en sus preparados comerciales y permanecer activo durante varios meses.
- Que se homogenice uniformemente en el diluyente, ya sea agua o alcohol, para que tenga la misma concentración en toda su masa.

- Que su tensión superficial sea baja para que penetre fácilmente en las rendijas y hendiduras de las superficies.
- Ser compatible con otros productos que se usen antes o simultáneamente.
- No ser tóxico a los tejidos humanos.
- No ser corrosivo para metales, maderas, superficies pintadas.
- Que sus propiedades organolépticas no sean desagradables, especialmente el olor, de preferencia deben ser inodoros.

No hay ninguna sustancia que reúna todas las características antes mencionadas, por lo que la tendencia actual es asociar dos o más productos que sumen sus ventajas.

Los agentes químicos que actúan sobre las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos: compuestos químicos inorgánicos y orgánicos.

- COMPUESTOS QUÍMICOS INORGÁNICOS:

Las sustancias inorgánicas suelen tener efectos sobre las bacterias por la dilución de sus iones o su efecto oxidante. Los compuestos inorgánicos se pueden clasificar en 4 grupos: ácidos y álcalis, sales minerales, halógenos y otros oxidantes.

- Ácidos y álcalis: el efecto sobre las bacterias está en relación directa con su grado de disociación; los ácidos y álcalis muy disociados ejercen un poder bactericida muy intenso.

- Sales minerales: las sales de los metales pesados pueden tener un efecto bactericida; de ellas, las mas intensas son las sales de plata y de mercurio, que son efectivas a concentraciones de 1 ppm.
- Halógenos: los compuestos halogenados tienen un efecto bactericida, por su acción oxidante, de ellos los más usados son: el yodo y sus derivados y el cloro y sus derivados.
- Otros oxidantes: aunque los halógenos deben en gran parte su efecto a su acción oxidante, existen otros compuestos considerados exclusivamente como oxidantes, entre los cuales se mencionan: el agua oxigenada, permanganato potásico, perboratos, persulfatos y peróxidos metálicos.

- COMPUESTOS QUIMICOS ORGANICOS

Son muy variados los compuestos orgánicos que tienen efectos sobre las bacterias; entre los mas importantes están: los alcoholes, fenoles, aldehídos, colorantes, detergentes y desinfectantes gaseosos.

- Alcoholes: el alcohol etílico tiene poder deshidratante y efecto desnaturalizante sobre las proteínas bacterianas. El alcohol absoluto tiene un poder bactericida casi nulo y el alcohol de 60° - 80° GL es efectivo pero débil, el alcohol isopropílico es más activo pero a su vez más tóxico.
- Fenoles: el fenol es un potente desinfectante que mata en algunas horas a casi todas las bacterias, se usa a concentraciones de 2 – 5 %; es menos activo frente a esporas, hongos y virus.

- Aldehídos: los más utilizados son el formaldehído y el glutaraldehído. El formaldehído actúa coagulando las proteínas bacterianas. El glutaraldehído activado con sales de estaño y a un pH alcalino es esterilizante, pues no sólo destruye las formas vegetativas de las bacterias sino también las esporas y los virus.
- Colorantes: ciertos colorantes tienen acción bacteriostática o bactericida según la concentración, esto se debe a la modificación del potencial óxido-reductor del medio, lo que inhibe el desarrollo de las bacterias. Entre estos están: azul de metileno, verde de malaquita y verde brillante.
- Detergentes: son agentes tensioactivos y se caracterizan por tener un grupo hidrófilo y otro lipófilo, lo que les da la propiedad de disminuir la tensión superficial de las sustancias sobre las que actúan. Según el signo de la carga eléctrica se dividen en aniónicos y catiónicos. Los aniónicos son los jabones, que tienen acción detergente de limpieza, pero cuyo poder bacteriostático es escaso o nulo. Los catiónicos son los detergentes derivados halogenados o no de las sales de amonio cuaternarias, que penetran fácilmente por las superficies, tienen un gran poder bacteriostático y son desodorantes.
- Desinfectantes gaseosos: además del formol usado en forma gaseosa y en cámaras cerradas como desinfectante, existen otras sustancias que en estado gaseoso son muy activas frente a los microorganismos entre las que están: el óxido de etileno, betapropiolactonas y glicoles.

Hay varios factores que influyen en la velocidad con que tienen lugar las reacciones químicas que dan como resultado la desinfección entre estos están: concentración, temperatura y pH.

El factor más importante es la concentración de las sustancias que reaccionan; es decir, la concentración de desinfectante y la cantidad de bacterias presentes.

La velocidad de destrucción incrementa al aumentar la temperatura. La variación de pH por encima o por debajo de 7.0 también aumenta la velocidad de destrucción. ⁽¹⁰⁾

5.3.5 LIMPIEZA Y SANITIZACION DE ÁREAS LIMPIAS

Los procedimientos de limpieza y sanitización son responsabilidad del personal capacitado para ello (farmacéuticos y técnicos), los cuales deben apegarse a los procedimientos escritos y aprobados por cada laboratorio.

Todos los utensilios que han sido usados para los análisis deben ser removidos del área y las superficies deben limpiarse con soluciones recientemente preparadas de detergentes, seguidos de la aplicación de los sanitizantes aprobados, los cuales deben permanecer en las superficies el tiempo suficiente para ejercer su acción desinfectante. Los sanitizantes deben ser rotados cada cierto tiempo para evitar el desarrollo de resistencia de los microorganismos a determinada sustancia.

Los procedimientos de re-limpieza se llevan a cabo siempre que se dé alguna circunstancia que lo amerite.

Las superficies cerca de la cámara de flujo laminar deben ser limpiadas en forma similar, se deben incluir las ventanas y las carretillas. Los estantes de almacenamiento de materiales deben ser vaciados, limpiados y sanitizados por lo menos una vez por semana, utilizando los agentes aprobados.

Los pisos en las áreas limpias deben ser limpiados con trapeadores especiales que no desprendan mota, esta limpieza se hace por lo menos una vez al día, cuando el área no se encuentra en uso.

Sólo deben usarse agentes limpiadores y sanitizantes aprobados, tomando en cuenta las compatibilidades, efectividad y si dejan residuos tóxicos inapropiados. Estos se controlarán para detectar su posible contaminación microbiana, las diluciones se mantendrán en recipientes limpios e identificados y no se almacenarán a menos que sean esterilizados. Los higienizantes y agentes de limpieza utilizados en las áreas limpias se esterilizarán antes de su uso. El procedimiento de uso y forma de preparación debe estar incluido también en los procedimientos escritos.

Todos los implementos usados para la limpieza de las áreas limpias, tales como franelas, esponjas y trapeadores son de uso exclusivo de estas áreas. Los trapeadores para el piso pueden ser utilizados únicamente en el área estéril y en la exclusiva más inmediata pero en ese orden.

Los trapeadores preferentemente deben ser descartados después del uso. Si los utensilios para la limpieza son reutilizados, deben ser limpiados, es decir, deben lavarse y esterilizarse para evitar una recontaminación, deben guardarse en un lugar limpio entre un uso y otro.

La basura deberá descartarse en bolsas plásticas apropiadas y debe sacarse haciendo el mínimo de agitación.

Los utensilios usados para la limpieza deben ser protegidos con bolsas plásticas u otro medio que permita mantener su condición higiénica, ésta protección puede ser retirada en la exclusiva inmediata al área, en este caso deberá aplicarse un sanitizante eficaz, como el alcohol isopropílico al 70% (esterilizado). Por el contrario si los utensilios son suministrados en bolsas selladas, estas pueden ingresar al área limpia y ser abiertas ahí, en este caso ya no es necesario sanitizar los utensilios en el área. Ningún otro tipo de envoltura debe ingresar al área limpia.

La limpieza de las exclusas debe realizarse al final y todo el procedimiento debe ser supervisado por personal capacitado.

En conclusión, la limpieza de los pisos, paredes y superficies debe realizarse diariamente, siempre iniciando con la limpieza del área limpia y posteriormente la exclusiva. Los utensilios deben ser guardados limpios y sanitizados, protegidos por bolsas selladas que mantengan su higiene. Estos deben ser desechados inmediatamente al presentar daños. ⁽⁴⁾

Ver anexo 9.

5.3.6 CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO

Las pruebas de esterilidad exigen medios de cultivo de alta calidad; los cuales deben ser garantizados. Los hay deshidratados; que proceden de firmas comerciales recomendadas; pero también se pueden preparar en el laboratorio cuando se cuenta con materiales de calidad. Todos ellos deben ser probados frente a dos gérmenes por lo menos, para comprobar la ausencia de acción bacteriostática. En lo que respecta a bacterias, levaduras y hongos filamentosos se debe tener seguridad en la exactitud de sus requerimientos nutricionales y confirmación de la esterilidad de los medios. (7)

Deben realizarse controles a los medios de cultivo para garantizar que cumplen con los requerimientos:

- Determinación de pH
- Prueba de Esterilidad
- Prueba de promoción de crecimiento
- Estabilidad

5.3.6.1 DETERMINACION DE pH

Preparar los medios de cultivo según las indicaciones del fabricante si son medios deshidratados, o seguir las formulaciones establecidas en los libros oficiales. Se procede a la esterilización y luego tomar una alícuota, medir el pH a una temperatura de 25°C en un potenciómetro validado. El pH debe corresponder con las especificaciones de los libros oficiales o las del fabricante.

5.3.6.2 PRUEBA DE ESTERILIDAD

Para comprobar la esterilidad de los medios de cultivo es necesario incubar una porción del lote preparado a la temperatura especificada (35°C – 37°C, o de 20°C - 25°C) por no menos de 14 días, paralelamente se incuba otra porción del medio ya inoculado, como control negativo.

5.3.6.3 PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO

Se preparan los medios de cultivo a evaluar, se esterilizan y luego se inoculan separadamente y por duplicado con 100 microorganismos viables o menos. Los microorganismos se seleccionan de acuerdo al tipo de medio a evaluar y se incuban según las condiciones especificadas. La prueba se considera satisfactoria si se obtiene evidencia visual del crecimiento en todos los contenedores inoculados dentro de los primeros 5 días de incubación.

Esta prueba se puede llevar a cabo simultáneamente con la prueba de esterilidad. El medio se considera no adecuado si las pruebas de esterilidad o de promoción de crecimiento no son satisfactorias. (7) Ver Anexo 10.

5.3.6.4 PRUEBA DE ESTABILIDAD

Una vez preparados y esterilizados los medios de cultivo deben ser almacenados en condiciones que les permitan conservar sus propiedades, tales como la temperatura, la cual puede oscilar entre 2°C - 25°C.

Para verificar que los medios conservan sus características es necesario determinar periódicamente el pH, realizar la prueba de esterilidad y la prueba de promoción de crecimiento, lo cual nos indica si las condiciones de almacenamiento son las adecuadas y a su vez determinar el tiempo de vida útil para cada medio.

5.3.7 EVALUACION DEL MATERIAL DE VIDRIO

El material de vidrio a emplearse debe ser previamente seleccionado y sometido a diferentes pruebas que demuestren una calidad aceptable para este tipo de análisis. Entre las pruebas a realizar se mencionan:

- Integridad de la cristalería
- Verificación del pH.
- Determinación de residuos bacteriostáticos o bactericidas.
- Comprobación de la esterilidad.

5.3.7.1 INTEGRIDAD DE LA CRISTALERIA

La cristalería destinada a este tipo de pruebas no debe presentar daños en su superficie, por lo tanto deberá descartarse todo aquello que presente quebraduras, superficies corroídas, rayadas, manchadas, con residuos de materiales quemados, etc.

5.3.7.2 VERIFICACION DE pH

Es importante determinar la neutralidad del pH de la cristalería posteriormente al procedimiento normal de lavado, para ello se escogen diferentes piezas al azar y se les añade a cada uno una gota de azul de bromo timol al 0.04 % y se observa la coloración presentada:

- pH ácido : color amarillo
- pH neutro : color azul verdoso
- pH básico: color azul

5.3.7.3 DETERMINACION DE RESIDUOS BACTERIOSTATICOS O BACTERICIDAS

La cristalería a emplearse en pruebas microbiológicas debe estar completamente libre de residuos de los detergentes empleados para su limpieza; ya que la presencia de estos residuos debido a sus propiedades bactericidas o bacteriostáticas puede tener un efecto nocivo en los resultados de las pruebas realizadas a las muestras en análisis.

PRUEBA PARA PLACAS DE PETRI:

Seleccionar 18 placas de petri y dividir las en tres grupos: A, B y C luego proceder como se indica:

- Grupo A: lavar las placas con el procedimiento de lavado habitual.
- Grupo B: lavar las placas con el procedimiento habitual y luego enjuagar 12 veces con agua desmineralizada.
- Grupo C: lavar las placas y dejar secar sin enjuagar.

Luego proceder a esterilizar todas las placas debidamente rotuladas.

Añadir a cada placa 1 mL de dilución pura de *Enterobacter aerògenes*; lo cual nos proporcionará un crecimiento de 50 – 150 colonias por placa.

Adicionar en cada placa 15 mL de agar nutritivo y mezclar.

Dejar solidificar e incubar las placas a 35 °C por 48 horas y proceder con el recuento.

- Una diferencia de menos del 15% en el promedio de los recuentos de colonias en los tres grupos nos indica que no hay ningún residuo de detergentes con propiedades bacteriostáticas o bactericidas, por lo tanto las placas son aceptables.

- Una diferencia de más del 15% en el promedio de los recuentos de colonias en los tres grupos nos indica la presencia de residuos de detergentes con propiedades bacteriostáticas o bactericidas, por lo tanto las placas no son aceptables.

- Una diferencia en el promedio de los recuentos de colonias de menos del 15% entre los grupos A y B y de mas del 15% entre los grupos A y C indican que el detergente tiene propiedades inhibitorias que desaparecen con el lavado habitual. (9)

5.3.7.4 COMPROBACION DE ESTERILIDAD

Es importante determinar si los procesos de esterilización de la cristalería son efectivos; ya que un proceso ineficaz conduce a la obtención de resultados falsos. A continuación se describen algunas pruebas para determinar la esterilidad de diferentes tipos de cristalería mas comúnmente usada en el laboratorio.

- Placas de Petri:

La prueba se realiza por duplicado. Se seleccionan 12 placas de petri estériles al azar y se le agregan 20 mL de agar nutritivo (previamente esterilizado y conservado en baño maría a 45 °C) a cada una, incubar a temperatura de 35 – 37 °C por 48 horas y luego proceder a examinar las placas. La ausencia de crecimiento indica que el procedimiento de esterilización de las placas es satisfactorio.

- Pipetas, frascos de dilución y tubos de ensayo:

La prueba se realiza por duplicado. Esterilizar el material antes mencionado y seleccionar al azar 10 pipetas, 5 frascos de dilución y 10 tubos de ensayo. Proceder a enjuagar cada uno de los materiales con Solución Reguladora de Fosfato de Butterfield (estéril), recolectar los lavados de los diferentes tipos de material en matraces erlenmeyer individuales. Filtrar por membrana cada uno de los lavados recolectados y colocar las membranas en placas petri estériles conteniendo agar recuento en placa. Rotular las placas e incubar a 35 – 37°C

por 48 horas. La ausencia de crecimiento en las membranas nos indica que el procedimiento de esterilización del material es adecuado.

- Probetas:

Tomar al azar 10 probetas esterilizadas, agregar a cada una 10 mL de caldo Tioglicolato y proceder a taponarlas con una torunda estéril y papel, incubar de 35– 37 °C por 48 horas, revisar cuidadosamente si hay crecimiento.

La ausencia de crecimiento indica la esterilidad de la cristalería.

5.3.8 METODOS DE ESTERILIZACION PARA MEDIOS DE CULTIVO Y

MATERIAL DE VIDRIO.

La esterilización es el conjunto de operaciones validadas, destinadas a eliminar o destruir todos los agentes patógenos y no patógenos causantes de enfermedades e infecciones, en sus formas viables y/o esporuladas.

Entre los métodos de esterilización aplicables a estos materiales tenemos:

- a) Calor húmedo.
- b) Calor seco.

CALOR HUMEDO:

Para llevar a cabo este tipo de esterilización debemos tener en cuenta que debemos evitar que los materiales esterilizados no vuelvan a contaminarse al terminar el proceso, para ello es necesario envolver el material a esterilizar en papel, bolsas u hojas de materiales especiales que permitan la salida del

aire y la entrada del vapor, pero que impidan el ingreso de microorganismos una vez terminada la esterilización.

Este tipo de esterilización se lleva a cabo empleando vapor de agua a altas temperaturas y con presiones elevadas; para tener estas condiciones se emplean equipos llamados autoclaves.

La combinación de tiempo y temperatura más usada es 121 °C por 15 minutos, aunque pueden emplearse otras combinaciones cuya efectividad sea comprobada.

CALOR SECO:

Este método consiste en colocar el material a esterilizar en hornos de aire caliente. Debido a que este tipo de esterilización es menos efectivo que el calor húmedo, es necesario que los tiempos de exposición sean más largos y las temperaturas sean más altas.

Las combinaciones de tiempo y temperaturas más usadas son:

115 ° - 118 ° C por 30 minutos

121 ° - 124 ° C por 15 minutos

126 ° - 129 ° C por 10 minutos

134 ° - 138 ° C por 3 minutos ⁽⁹⁾

**5.4 IDENTIFICACION DE LAS CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES
DE UN ÁREA DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO DE
INYECTABLES Y VACUNAS.**

5.4 IDENTIFICACION DE LAS CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE UN AREA DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLOGICO DE INYECTABLES Y VACUNAS.

5.4.1 FACTORES AMBIENTALES EXTERNOS

El Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico debe contar con instalaciones adecuadas que cumplan con las normativas internacionales. Deben considerarse tanto factores ambientales externos como requisitos internos que deben cumplir las instalaciones destinadas al análisis microbiológico.

Entre los factores ambientales externos a ser considerados están:

- Las áreas aledañas no deben poseer condiciones insalubres como malos olores, contaminantes, insectos y recintos de basura.
- El área donde se ubican las instalaciones debe poseer un buen drenaje y sin peligro de inundaciones.
- El diseño de la planta debe permitir un fácil acceso al personal a las diferentes áreas.
- Los servicios de agua, recolección de basura, electricidad y combustible deben ser accesibles en el presente y en el futuro.
- La zona debe ser de fácil acceso y con facilidades de parqueo. (1)

5.4.2 CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS ESTÉRILES.

El área destinada para el análisis microbiológico de medicamentos estériles debe poseer características estructurales especiales que garanticen las condiciones asépticas indispensables para la obtención de resultados satisfactorios en los análisis. ⁽¹⁰⁾

Todas las superficies expuestas serán lisas, impermeables sin ranuras ni fisuras; con el fin de minimizar la liberación o acumulación de partículas y microorganismos, permitiéndose la aplicación repetida de agentes de limpieza y sanitizantes.

Las paredes deben estar revestidas con materiales adecuados como pintura epóxica, azulejos sin junta y otros. No se debe utilizar revestimientos que presenten juntas, ángulos o aristas, deben emplearse colores claros pero descartar el blanco.

El cielo falso debe ser integro y sellado herméticamente para prevenir la contaminación proveniente del exterior.

Los pisos, paredes y zócalos, deben ser lisos y no absorbentes, de materiales específicos para áreas asépticas y con ángulos redondeados (zócalos sanitarios). Las ventanas deben ser de vidrio de una sola pieza y estar selladas a fin de evitar la entrada de polvo e insectos o cualquier tipo de contaminación ambiental.

El diseño del sistema y acondicionamiento del aire debe garantizar que la temperatura y humedad relativa en las áreas limpias aseguran el control del ambiente microbiológico, la correcta conservación de los materiales y el confort del personal.

El aire que ingrese a la central por los sistemas de ventilación y climatización debe ser filtrado con filtros aptos para retener impurezas contaminantes, que deben ser reemplazados periódicamente y/o decontaminados. No se debe admitir el uso de ventiladores o cualquier otro dispositivo agitador de aire. Los patrones de flujo de aire no deben distribuir partículas generadas por las personas, las operaciones o las máquinas.

La temperatura debe oscilar entre 20° y 22°C durante todo el año. La humedad ambiental debe ser constante y controlada dentro de los valores normales que impidan la condensación de vapor en las superficies; aproximadamente entre un 35% - 45% de humedad relativa. Esta debe ser monitoreada diariamente, especialmente en las zonas de depósito o almacenamiento de materiales.

Para reducir la acumulación de polvo y garantizar una limpieza e higienización efectiva, la relación de dimensiones de áreas y equipos se diseñará convenientemente, evitándose lugares de difícil acceso.

El mobiliario no debe ser excesivo para facilitar el desplazamiento interno y la limpieza. La iluminación debe ser clara, intensa y no calórica.

Las lámparas u otra fuente de luz; deberán estar empotradas en los techos y poseer pantalla protectora para evitar la acumulación de polvo.

El sistema eléctrico debe ser adecuado para el correcto funcionamiento de los equipos y cumplir con las normas de seguridad además los tomacorrientes deben estar protegidos.

5.4.3 SECCIONES DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

En su diseño el Laboratorio de Microbiología no debe ocupar una sola sala, sino más bien; debe conformarse por áreas diferenciadas. (Ver anexo 11).

5.4.3.1 INGRESO DE PERSONAL Y VESTIDORES

El personal que ingresa de la calle debe cambiarse de ropa para entrar al laboratorio con el equipo adecuado.

Debe contarse con duchas y los elementos adecuados para la higiene. Los locales destinados al cambio de ropa deben estar diseñados como esclusas de aire, para proporcionar la separación física de las diferentes etapas de cambio y minimizar la posibilidad de contaminación microbiana y por partículas de la ropa protectora. La esclusa final de los locales de cambio debe poseer aire filtrado que en condiciones de reposo tendrá la misma clase que el siguiente local de acceso. Este local debe poseer además un espejo y una gráfica donde puedan comprobarse el uso correcto del uniforme. (9)

5.4.3.2 RECEPCION DE MUESTRAS

El ingreso de las muestras para análisis se hará por medio de ventanilla. Las muestras deben ir acompañadas por la documentación respectiva.

5.4.3.3 ESTANTERIA PARA EL ALMACENAMIENTO DE UTENSILIOS, CRISTALERÍA Y MEDIOS DE CULTIVO.

La estantería debe mantenerse en buenas condiciones, libre de suciedad, debe incluirse en el programa general de limpieza. El material del cual esté hecha debe ser liso, de fácil limpieza, no presentar bordes o juntas que impidan limpiar adecuadamente y además debe identificarse la ubicación de los diferentes materiales que en ellos se almacenan.

5.4.3.4 PREPARACION DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Debe contarse con un espacio destinado a la preparación de los reactivos y medios de cultivo que se utilizar diariamente. Esta área debe contar con los utensilios necesarios: balanza, pH metro, hot plate, etc.

5.4.3.5 ESTERILIZACION DE CRISTALERÍA, MEDIOS DE CULTIVO Y OTROS.

Luego de la selección del material, medios de cultivo y utensilios que se utilizarán en determinadas pruebas deben ser esterilizados de acuerdo a su naturaleza ya sea por calor seco o calor húmedo.

De igual forma cuando ya han sido utilizados en las pruebas, deben ser decontaminados para evitar la proliferación de microorganismos.

5.4.3.6 ALMACENAMIENTO PARA MATERIALES ESTERILES.

En esta área pueden ser almacenados medios de cultivo, cristalería y ropa estéril debidamente protegidos. Los medios estériles deben ser almacenados preferentemente en refrigeración; la cristalería y ropa para las áreas limpias se almacenarán en sus respectivos empaques en los que fueron esterilizados y se mantendrán así hasta el momento de usarse.

Los estantes de almacenamiento de materiales deben ser vaciados, limpiados y sanitizados por lo menos una vez por semana, utilizando los agentes aprobados.

5.4.3.7 AREA ESTERIL

Para el ingreso del personal a las áreas estériles es necesario el empleo de esclusas, generalmente dos. Una para el ingreso y cambio de ropa y otra para ingresar directamente al área limpia con el equipo adecuado.

Debe contar con duchas para el personal y los elementos adecuados para su higiene. Las instalaciones para el lavado y secado de manos se ubicarán solamente en la primera exclusiva del local de cambio que por diseño serán sanitarias. Los locales destinados al cambio de ropa deben estar diseñados como esclusas de aire, para proporcionar la separación física de las diferentes etapas de cambio y minimizar la posibilidad de contaminación microbiana y por partículas de la ropa protectora.

La esclusa final de los locales de cambio debe poseer aire filtrado que en condiciones de reposo tendrá la misma clase que el siguiente local de acceso. Este local debe poseer además un espejo y una gráfica donde puedan comprobarse el uso correcto del uniforme. ⁽⁹⁾

El área limpia para análisis de muestras estériles debe cumplir con especificaciones estructurales, ambiente estéril, temperatura y humedad relativa. Debe contar además con flujo laminar.

5.4.3.8 INCUBADORAS

El área para incubación de las muestras debe tener instalaciones eléctricas adecuadas, asimismo no debe estar en un área de mucho tránsito para evitar vibraciones o manipulaciones accidentales.

5.4.3.9 LECTURA DE RESULTADOS

Se ubicarán en ésta área los contadores de colonias, espectrofotómetros, lámparas de fluorescencia y todos aquellos equipos necesarios para la detección de los resultados.

5.4.3.10 BACTERIOTECA

El laboratorio debe contar con una bacterioteca en la cual se conserven cepas patrón de acuerdo a las necesidades de investigación. La bacterioteca debe poseer condiciones ambientales apropiadas.

5.4.3.11 RECINTO PARA ANIMALES VIVOS

Los recintos para animales deben mantener uniformidad en las condiciones ambientales: temperatura apropiada (generalmente se emplea aire acondicionado), luz adecuada, no calòrica y manteniendo la relación de horas de iluminación del día y la noche, el área debe estar además aislada de ruidos que puedan estresar a los animales de prueba.

Adicionalmente los recintos deben construirse con materiales que equilibren las necesidades del animal con la facilidad para llevar a cabo la sanidad. Deben tener superficies lisas, impermeables, con el mínimo de rebordes o sobresalientes, ángulos, esquinas y superficies que se traslapen, de tal manera que la acumulación de suciedad, desechos y humedad se reduzcan y sea posible una limpieza y desinfección satisfactoria.

Deben estar contruidos con materiales durables que resistan la corrosión y que soporten la manipulación ruda sin desportillarse, cuartearse u oxidarse. En algunas situaciones, materiales menos durables, como la madera, pueden ofrecer un ambiente mas apropiado (tales como perreras o corrales) y pueden usarse para construir perchas, estructuras para que trepen, áreas de descanso y rejas perimetrales para los encierros primarios.

5.4.3.12 PRUEBAS BIOLÓGICAS

El área para pruebas biológicas debe estar alejada al recinto de animales para facilitar el desplazamiento y disminuir la contaminación ambiental. Debe contar con: temperatura apropiada (generalmente se emplea aire acondicionado), luz adecuada, no calórica y manteniendo la relación de horas de iluminación del día y la noche, el área debe estar además aislada de ruidos.

5.4.3.13 OFICINAS, BIBLIOTECA Y ARCHIVOS

El área de oficinas, biblioteca y archivos se mantiene separada del área de trabajo debido a que se considera un área negra. Deberá contar con el mobiliario y equipos necesarios, sistemas informáticos, etc.

(10)

**5.5 PROPUESTA DE MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE INYECTABLES Y VACUNAS.**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

PARA INYECTABLES Y VACUNAS

ELABORADO POR

REVISADO POR

AUTORIZADO POR

NOVIEMBRE DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

INDICE

Introducción	111
Objetivo	111
Alcance	111
Responsabilidad	111
Procedimientos Normalizados de Análisis	
Prueba de Esterilidad de Inyectables, Método Directo	
1. Muestra Líquida de 1 mL o menos.	113
2. Muestra Líquida de 1 mL – 40 mL	122
3. Muestra Sólida de 50 mg o menos.	131
4. Muestra Sólida de 50 mg – 300 mg	140
5. Muestra Sólida de 300 mg – 5 g	149
6. Muestra Sólida de 5 g o más	158
7. Muestra de antibióticos Liofilizados	167
Método de Filtración por Membrana	
8. Muestra Líquida Miscible en Medio Acuoso	177
9. Muestra Altamente Viscosa Miscible en Medio Acuoso	188
10. Muestra Líquida Bacteriostática o Fungistática	198
11. Muestra Oleosa	210
12. Muestra de Antibióticos Liofilizados	220

Prueba de Pirógenos

13. Método Biológico 232

14. Método Bioquímico, Prueba de LAL 242

Vacunas

15. Prueba de Esterilidad, Filtración por Membrana 255

16. Prueba de Toxicidad, Método Biológico 266

Prueba de Seguridad

17. Método Biológico 272

INTRODUCCION

En el presente manual se detallan los principales procedimientos microbiológicos normalizados para los análisis de medicamentos inyectables y vacunas contemplados en libros oficiales. El manual comprende procedimientos para determinar la esterilidad y la presencia de pirógenos, así como la toxicidad en las muestras a analizar.

OBJETIVO

Describir los procedimientos normalizados para el análisis microbiológico de inyectables y vacunas.

ALCANCE

Este manual se aplica a todo laboratorio destinado al análisis microbiológico de medicamentos inyectables y/o vacunas.

RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del personal de laboratorio seguir las normas establecidas y realizar los procedimientos en forma adecuada.

PRUEBA DE ESTERILIDAD DE INYECTABLES
MÉTODO DIRECTO

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 1 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método directo en muestras de medicamentos parenterales en presentaciones de 1 mL o menores.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de medicamentos parenterales en presentaciones de 1 mL o menores.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovales a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 2 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
2. Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
3. Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 3 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Las pruebas de esterilidad en los inyectables comprenden la determinación de bacterias, hongos y levaduras. Estas pruebas se han subdividido de acuerdo al volumen de la muestra a ensayar, en el caso de muestras líquidas en presentación de 1 mL o menos, se emplea la totalidad del líquido, inoculándolo en tubos de ensayo que contienen medio Tioglicolato o medio Caseína de soya digerido respectivamente.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 4 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Material

- a) Gradilla estéril
- b) Cabina de flujo laminar
- c) Lupa o lente de aumento
- d) Incubadora con termómetro graduado
- e) Hot plate
- f) 22 Tubos de vidrio estériles 20 x 200 mm
- g) Probetas estériles
- h) 2 Matraz erlenmeyer de 250 ml

Medios de Cultivo

- a) Medio Tioglicolato
- b) Medio Caseína de soya digerido

III. PROCEDIMIENTO

MÉTODO PARA DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Utilizar 10 envases de muestra de 1 mL o menos previamente desinfectados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 5 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter la totalidad del contenido de un frasco en cada uno de 10 tubos que contienen 10 mL de Medio Tioglicolato.
- 4) Incubar los tubos a una temperatura de 30° a 35° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 10 mL de medio estéril, el cual servirá como control negativo.
- 5) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 6) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 7) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez: crecimiento bacteriano.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Utilizar 10 envases de muestra de 1 mL o menos previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 6 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

- 3) Verter la totalidad del contenido de un frasco en cada uno de 10 tubos que contienen 10 mL de Medio Caseína de Soya digerido.
- 4) Incubar los tubos a una temperatura de 20° a 25° C por 7 a 14 días. Incubar adicionalmente un tubo con 10 mL de medio estéril, el cual servirá como control negativo.
- 5) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 6) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 7) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día, hasta el 14° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 7 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 2) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

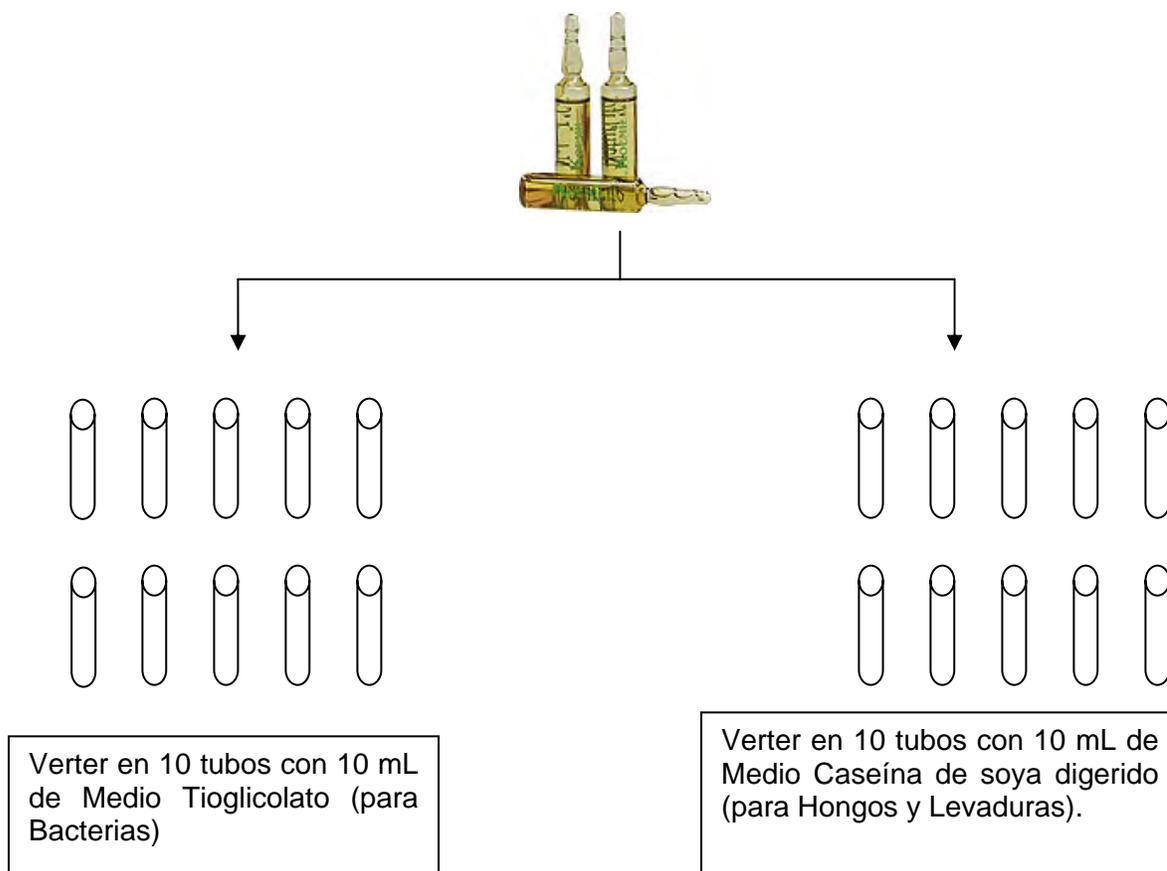
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 2) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 3) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 8 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 viales de 1 mL o menos y dividir en dos grupos de 10 unidades



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0001	Página 9 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá 10 mL de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos a partir del tercer día. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, primera edición, 1989.
- Microbiología Médica, Editorial Manual Moderno, 14° edición, 1992.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 1 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método directo en muestras de medicamentos parenterales en presentaciones de 1 mL a 40 mL.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de medicamentos parenterales en presentaciones de 1 mL a 40 mL.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovales a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 2 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 3 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Las pruebas de esterilidad en los inyectables comprenden la determinación de bacterias, hongos y levaduras. Estas pruebas se han subdividido de acuerdo al volumen de la muestra a ensayar, en el caso de muestras líquidas en presentación de 1 mL a 40 mL, se emplea la mitad del contenido del envase pero no menos de 1 mL, inoculándolo en tubos de ensayo que contienen medio Tioglicolato o medio Caseína de soya digerido respectivamente. El procedimiento presentado a continuación se hará usando como muestra viales de 2 mL.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 4 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

Equipo y Material

- a) Gradilla estéril
- b) Cabina de flujo laminar
- c) Lupa o lente de aumento
- d) Incubadora con termómetro graduado
- e) Hot plate
- f) 22 Tubos de vidrio estériles
- g) Probetas estériles
- h) 2 Matraz erlenmeyer de 500 ml

Medios de Cultivo

- a) Medio Tioglicolato
- b) Medio Caseína de soya digerido

III. PROCEDIMIENTO

MÉTODO PARA DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Utilizar 10 envases de muestra de 2 mL previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 5 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó	Autorizó	

- 3) Verter 1mL del contenido de los frascos en cada uno de 10 tubos que contienen 10 mL de Medio Tioglicolato.
- 4) Incubar los tubos a una temperatura de 30° a 35° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 10 mL de medio estéril, el cual servirá como control negativo.
- 5) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 6) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 7) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez: crecimiento bacteriano.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Utilizar 10 envases de muestra de 2 mL previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 6 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 3) Verter 1 mL del contenido de los frascos en cada uno de 10 tubos que contienen 10 mL de Medio Caseína de Soya digerido.
- 4) Incubar los tubos a una temperatura de 20° a 25° C por 7 a 14 días. Incubar adicionalmente un tubo con 10 mL de medio estéril, el cual servirá como control negativo.
- 5) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 6) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 7) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día, hasta el 14° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 7 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 2) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

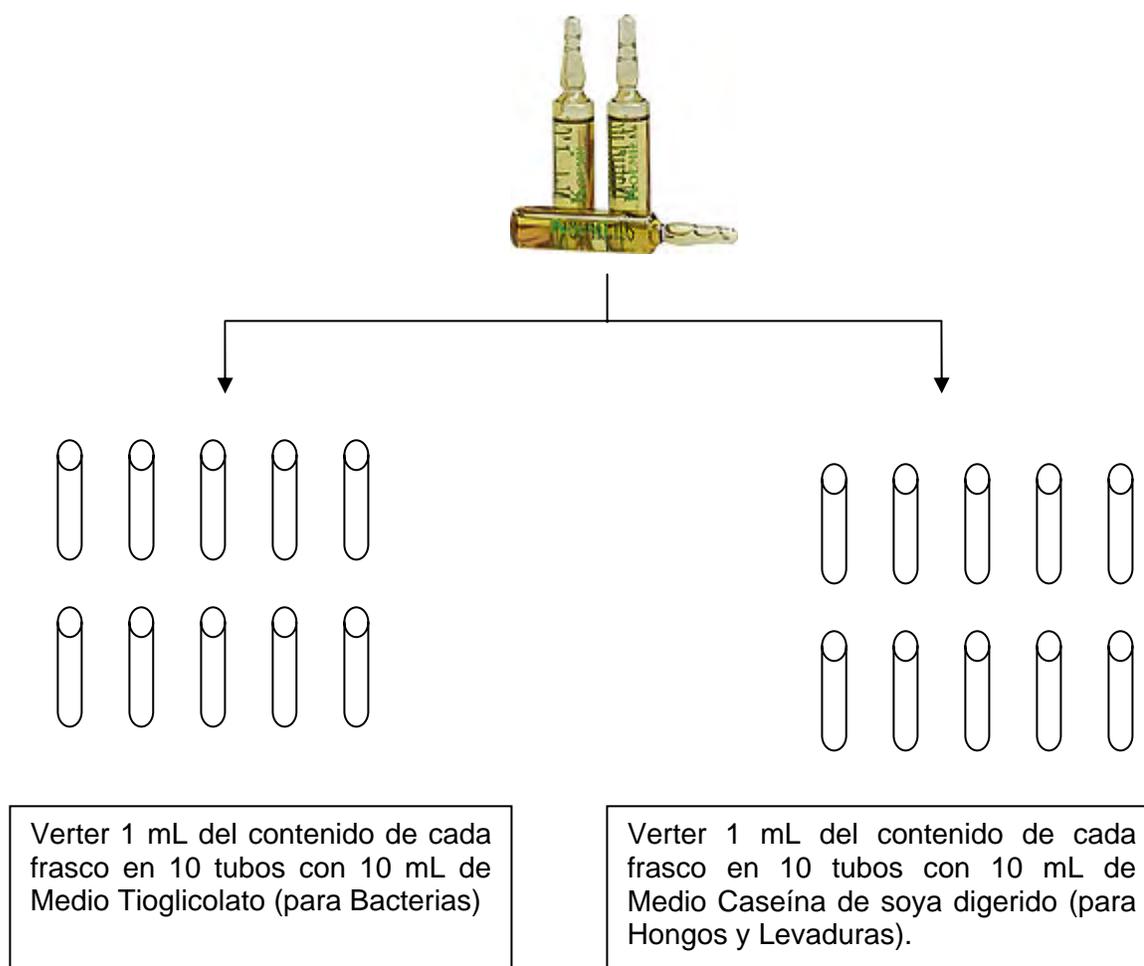
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Los viales deben ser desinfectados antes de proceder con el análisis.
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 4) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 8 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 viales de 2 mL y dividir en dos grupos de 10 unidades



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0002	Página 9 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá 10 mL de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos a partir del tercer día. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Microbiología Médica, Editorial Manual Moderno, 14° edición, 1992.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		MI - 0003	1 de 9
		Vigente a partir de:		
Elaboró		Revisó	Autorizó	

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método directo en muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 50 mg o menos.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 50 mg o menos.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0003	Página 2 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

Medicamento Parenteral: son preparaciones destinadas para ser administradas a través de la piel o los tejidos.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0003	Página 3 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaría y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Las pruebas de esterilidad en los inyectables comprenden la determinación de bacterias, hongos y levaduras. En el caso de las muestras sólidas que contienen 50 mg o menos son reconstituidas con un medio dispersante acuoso (agua estéril o solución salina normal) y luego se evalúan empleando medio Tioglicolato alternativo para Bacterias y medio Caseína de soya digerido para Hongos y Levaduras.

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		MI - 0003	4 de 9
Vigente a partir de:				
Elaboró	Revisó		Autorizó	

II. EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

Equipo y Material

- a) Incubadora con termómetro graduado
- b) Hot plate
- c) Cabina de flujo laminar
- d) Gradilla estéril
- e) Pipeteador
- f) 4 Tubos de vidrio estériles
- g) Probetas estériles
- h) 2 Matraz erlenmeyer de 250 ml

Medio de Cultivo y diluyentes:

- a) Medio Tioglicolato Alternativo
- b) Medio Caseína de soya digerido
- c) Agua estéril o Solución salina normal.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0003	Página 5 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Utilizar 20 envases de muestra que contienen 50 mg o menos previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter el contenido de los frascos en 1 erlenmeyer que contiene 100 mL de medio acuoso dispersante (agua estéril o solución salina normal).
- 4) Mezclar hasta completa disolución.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Tioglicolato Alternativo.
- 2) Incubar a una temperatura de 30° a 35° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		MI - 0003	6 de 9
			Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

- 4) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 5) Observar los tubos a partir del 3º, 5º y 7º día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez: crecimiento bacteriano.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Caseína de soya digerido.
- 2) Incubar a una temperatura de 20º a 25º C por 7 a 14 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Observar los tubos a partir del 3º, 5º y 7º día, hasta el 14º día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

IV. CALCULOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0003	Página 7 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
- 2) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

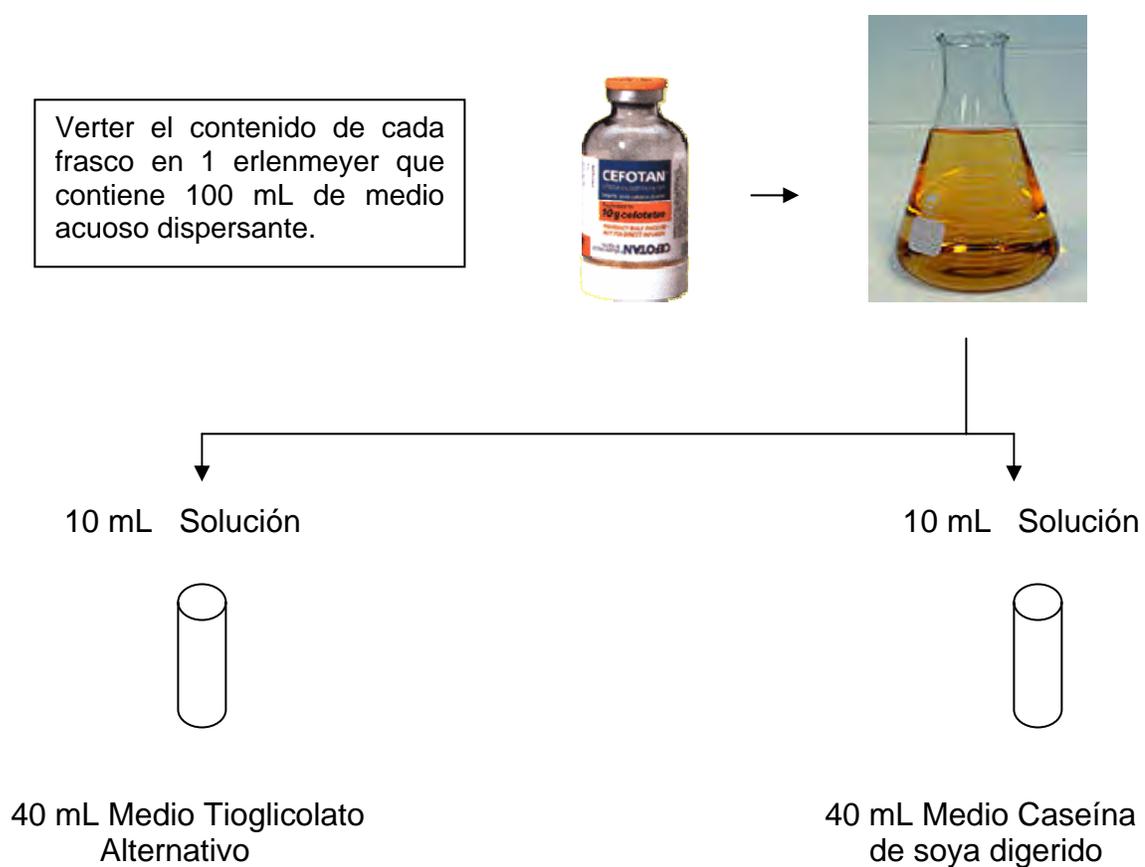
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Los viales deben ser desinfectados antes de proceder con el análisis.
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 4) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0003	Página 8 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 viales con 50 mg o menos.



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0003	Página 9 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá 40 mL de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar

Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos a partir del tercer día. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Microbiología Médica, Editorial Manual Moderno, 14° edición, 1992.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 1 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método directo en muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 50 - 300 mg.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 50 - 300 mg.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

Medicamento Parenteral: son preparaciones destinadas para ser administradas a través de la piel o los tejidos.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 2 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 3 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Las pruebas de esterilidad en los inyectables comprenden la determinación de bacterias, hongos y levaduras. En el caso de las muestras sólidas que contienen de 50 - 300 mg, son reconstituidas con un medio dispersante acuoso (agua estéril o solución salina normal) y luego se evalúan empleando medio Tioglicolato alternativo para Bacterias y medio Caseína de soya digerido para Hongos y Levaduras.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 4 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

Equipo y Material

- a) Incubadora con termómetro graduado
- b) Hot plate
- c) Cabina de flujo laminar
- d) Gradilla estéril
- e) Pipeteador
- f) 4 Tubos de vidrio estériles
- g) Probetas estériles
- h) 2 Matraz erlenmeyer de 250 ml

Medio de Cultivo y diluyentes:

- a. Medio Tioglicolato Alternativo
- b. Medio Caseína de soya digerido
- c. Agua estéril o Solución salina normal.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 5 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Utilizar 20 envases de muestra que contienen 50 – 300 mg.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter la mitad del contenido de los frascos (pero no menos de 50 mg) en un erlenmeyer que contiene 100 mL de medio acuoso dispersante (agua estéril o solución salina normal).
- 4) Mezclar hasta completa disolución.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Tioglicolato Alternativo.
- 2) Incubar a una temperatura de 30° a 35° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 6 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

- 4) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 5) Observar los tubos a partir del 3º, 5º y 7º día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez: crecimiento bacteriano.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Caseína de soya digerido.
- 2) Incubar a una temperatura de 20º a 25º C por 7 a 14 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Observar los tubos a partir del 3º, 5º y 7º día, hasta el 14º día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

IV. CALCULOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 7 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
- 2) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

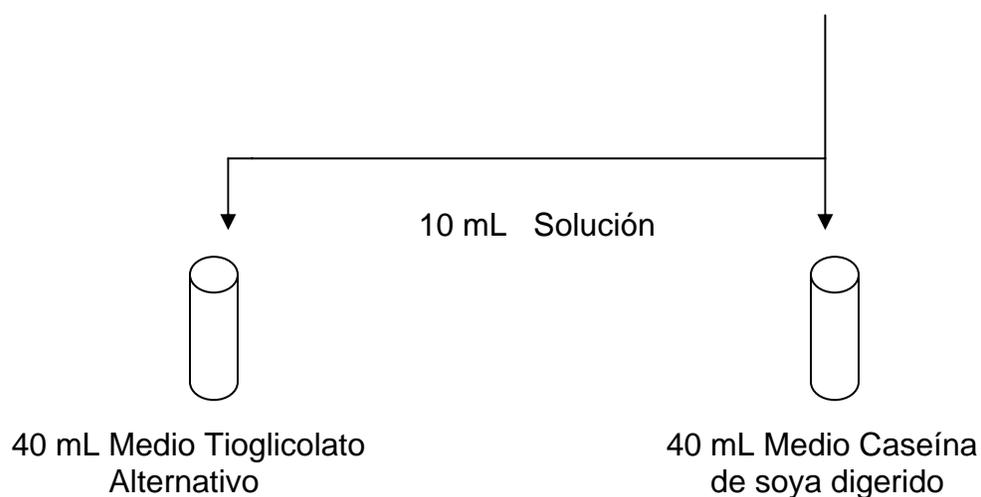
- 1) Los viales deben ser desinfectados antes de proceder con el análisis.
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 4) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 8 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 viales con 50 - 300 mg.

Verter la mitad del contenido de cada frasco, pero no menos de 50 mg en un erlenmeyer que contiene 100 mL de medio acuoso dispersante.



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0004	Página 9 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá 40 mL de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos a partir del tercer día. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Microbiología Médica, Editorial Manual Moderno, 14° edición, 1992.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 1 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método directo en muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 300 mg – 5 g.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 300 mg – 5 g.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 2 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 3 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaría y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Las pruebas de esterilidad en los inyectables comprenden la determinación de bacterias, hongos y levaduras. En el caso de las muestras sólidas que contienen de 300 mg – 5 g, son reconstituidas con un medio dispersante acuoso (agua estéril o solución salina normal) y luego se evalúan empleando medio Tioglicolato alternativo para Bacterias y medio Caseína de soya digerido para Hongos y Levaduras.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 4 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

Equipo y Material

- a) Incubadora con termómetro graduado
- b) Hot plate
- c) Cabina de flujo laminar
- d) Gradilla estéril
- e) Pipeteador
- f) 4 Tubos de vidrio estériles
- g) Probetas estériles
- h) 3 Matraz erlenmeyer de 250 ml

Medio de Cultivo y diluyentes:

- a. Medio Tioglicolato Alternativo
- b. Medio Caseína de soya digerido
- c. Agua estéril o Solución salina normal.

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Utilizar 20 envases de muestra que contienen 300 mg – 5 g previamente desinfectados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 5 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter 150 mg del contenido de los frascos en un erlenmeyer que contiene 100 mL de medio acuoso dispersante (agua estéril o solución salina normal).
- 4) Mezclar hasta completa disolución.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Tioglicolato Alternativo.
- 2) Incubar a una temperatura de 30° a 35° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 4) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 5) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez: crecimiento bacteriano.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 6 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

MÉTODO PARA DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Caseína de soya digerido.
- 2) Incubar a una temperatura de 20° a 25° C por 7 a 14 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día, hasta el 14° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 7 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 2) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Los viales deben ser desinfectados antes de proceder con el análisis.
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 4) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

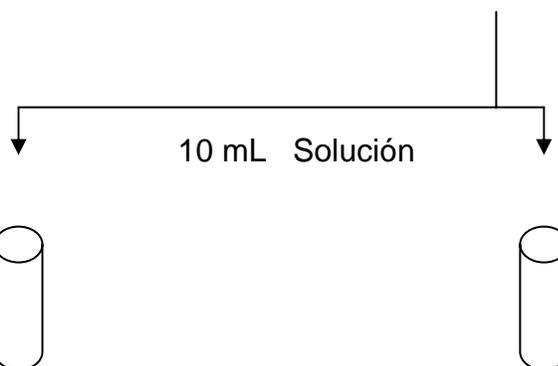
	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 8 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 viales con 300 mg – 5 g



Verter 150 mg de cada frasco, en un erlenmeyer que contiene 100 mL de medio acuoso dispersante.



40 mL Medio Tioglicolato
Alternativo

40 mL Medio Caseína
de soya digerido

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0005	Página 9 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá 40 mL de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos a partir del tercer día. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Microbiología Médica, Editorial Manual Moderno, 14° edición, 1992.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0006	Página 1 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método directo en muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 5 g o más.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de medicamentos parenterales sólidos en presentaciones de 5 g o más.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

Medicamento Parenteral: son preparaciones destinadas para ser administradas a través de la piel o los tejidos.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0006	Página 2 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0006	Página 3 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaría y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Las pruebas de esterilidad en los inyectables comprenden la determinación de bacterias, hongos y levaduras. En el caso de las muestras sólidas que contienen de 5 g o más, son reconstituidas con un medio dispersante acuoso (agua estéril o solución salina normal) y luego se evalúan empleando medio Tioglicolato alternativo para Bacterias y medio Caseína de soya digerido para Hongos y Levaduras.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0006	Página 4 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

Equipo y Material

- a) Incubadora con termómetro graduado
- b) Hot plate
- c) Cabina de flujo laminar
- d) Gradilla estéril
- e) Pipeteador
- f) 4 Tubos de vidrio estériles
- g) Probetas estériles
- h) 2 Matraz erlenmeyer de 250 ml

Medio de Cultivo y diluyentes:

- a. Medio Tioglicolato Alternativo
- b. Medio Caseína de soya digerido
- c. Agua estéril o Solución salina normal.

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Utilizar 6 envases de muestra que contienen 5 g o más previamente desinfectados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0006	Página 5 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter 500 mg del contenido de los frascos en un erlenmeyer que contiene 100 mL de medio acuoso dispersante (agua estéril o solución salina normal).
- 4) Mezclar hasta completa disolución.

MÉTODO PARA DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Tioglicolato Alternativo.
- 2) Incubar a una temperatura de 30° a 35° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 4) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 10 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 5) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez: crecimiento bacteriano.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0006	Página 6 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

MÉTODO PARA DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Tomar 10 mL de la solución preparada y colocar en 1 tubo de ensayo que contiene 40 mL de medio Caseína de soya digerido.
- 2) Incubar a una temperatura de 20° a 25° C por 7 a 14 días. Incubar adicionalmente un tubo con 40 mL de medio estéril, el cual servirá como control.
- 3) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día, hasta el 14° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0006	Página 7 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

- 2) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Los viales deben ser desinfectados antes de proceder con el análisis.
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 4) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

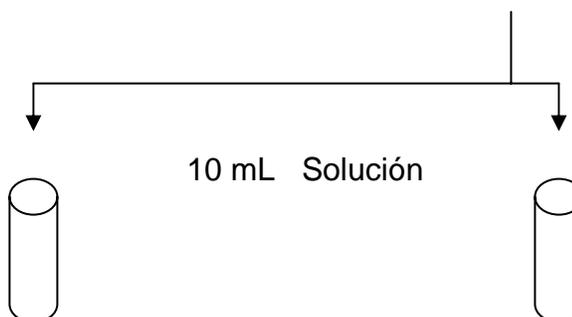
	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0006	Página 8 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 6 viales con 5 g o más.



Verter 500 mg de cada frasco, en un erlenmeyer que contiene 100 mL de medio acuoso dispersante.



40 mL Medio Tioglicolato
Alternativo

40 mL Medio Caseína
de soya digerido

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0006	Página 9 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá 40 mL de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos a partir del tercer día. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Microbiología Médica, Editorial Manual Moderno, 14° edición, 1992.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0007	Página 1 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método directo en muestras de antibióticos en forma de polvo liofilizado.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de antibióticos en forma de polvo liofilizado.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

-**Estéril**: libre de todo organismo vivo.

-**Bacterias**: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

-**Hongos**: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

-**Levaduras**: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0007	Página 2 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

-**Antibióticos:** medicamentos empleados para tratar infecciones bacterianas y que por su efecto mata o impide el crecimiento de ciertas clases de bacterias.

- **Polvo Liofilizado:** medicamento al cual se le ha eliminado el agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0007	Página 3 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Las pruebas de esterilidad en los inyectables comprenden la determinación de bacterias, hongos y levaduras. Dichas pruebas son aplicadas también a los antibióticos en forma de polvos liofilizados. Para el ensayo deberá tomarse el contenido total de cada envase para suministrar no menos de 200 mg.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0007	Página 4 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO

Equipo y Material

- a) Gradilla estéril
- b) Cabina de flujo laminar
- c) Lupa o lente de aumento
- d) Incubadora con termómetro graduado
- e) Hot plate
- f) 42 Tubos de vidrio estériles
- g) Probetas estériles
- h) 2 Matraz erlenmeyer de 500 ml

Medio de Cultivo:

- a) Medio MA (Tioglicolato pH 7.1 ± 0.2)
- b) Medio ME (Digerido pancreático de caseína de soya pH 7.3).

III. PROCEDIMIENTO

MÉTODO PARA DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Utilizar 20 envases de muestra de polvo liofilizado previamente desinfectados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0007	Página 5 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter el contenido completo de cada frasco suministrando no menos de 200 mg, en cada uno de 20 tubos que contienen 20 mL de Medio MA (Tioglicolato pH 7.1 ± 0.2), mezclar.
- 4) Incubar los tubos a una temperatura de 30° a 35° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 20 mL de medio estéril, el cual servirá como control negativo.
- 5) Agitar los tubos suavemente cada 3 días, hasta completa solubilidad del antibiótico.
- 6) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 7) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 20 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.
- 8) Observar los tubos a partir del 3°, 5° y 7° día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez: crecimiento bacteriano.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0007	Página 6 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

MÉTODO PARA DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Utilizar 20 envases de muestra de polvo liofilizado previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter el contenido completo de cada frasco en cada uno de 20 tubos que contienen 90 mL de Medio ME ((Digerido pancreático de caseína de soya pH 7.3), mezclar.
- 4) Incubar los tubos a una temperatura de 20° a 25° C por 7 días. Incubar adicionalmente un tubo con 90 mL de medio estéril, el cual servirá como control negativo.
- 5) Agitar los tubos suavemente cada 3 días, hasta completa solubilidad del antibiótico.
- 6) Examinar los tubos al tercero, cuarto, quinto hasta séptimo día. No debe haber crecimiento.
- 7) Si se presenta turbidez en alguno de los tubos, repetir el ensayo con 20 muestras más e incubar bajo las mismas condiciones.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0007	Página 7 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 8) Observar los tubos a partir del 3^o, 5^o y 7^o día, hasta el 14^o día. Ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
- 2) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

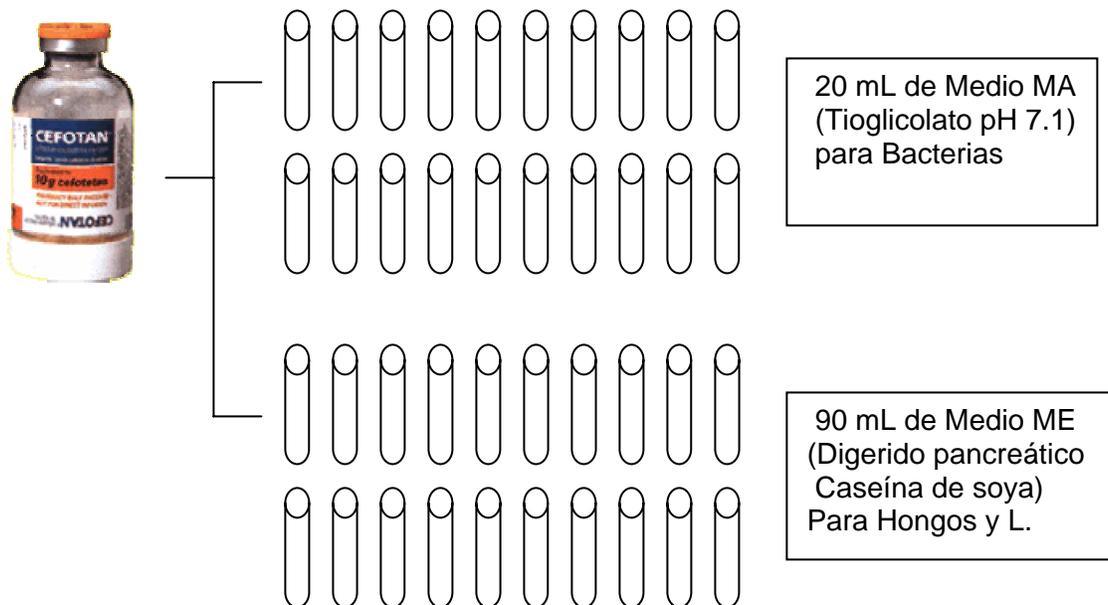
- 1) Los viales deben ser desinfectados antes de proceder con el análisis.
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0007	Página 8 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

- 3) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 4) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 40 viales de muestra de antibiótico en forma de polvo liofilizado y dividir en dos grupos de 20 unidades



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0007	Página 9 de 9
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO DIRECTO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá igual volumen de Medio de Cultivo estéril.



- Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.
- Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.
- Agitar suavemente los tubos cada 3 días para solubilizar la muestra completamente.

Observar los tubos a partir del tercer día. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Microbiología Médica, Editorial Manual Moderno, 14^o edición, 1992.
- Antibióticos: <http://es.wikipedia.org/wiki/antibióticos>. Año 2007.

I. ANEXOS: No aplica.

MÉTODO DE FILTRACION POR MEMBRANA

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 1 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método indirecto o de filtración por membrana en muestras líquidas miscibles en medio acuoso.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a inyectables líquidos miscibles en medio acuoso.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Filtración por membrana: procedimiento mediante el cual la muestra soluble o solubilizada es filtrada a través de membranas de celulosa (0.45 micras), quedando retenidos los microorganismos en la membrana.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 2 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 3 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El empleo del método indirecto o de filtración por membrana es una técnica muy usada debido a que es más rápida y con menor costo que el método directo. El volumen de muestra a tomar varía de acuerdo a la presentación de ésta.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0008	Página 4 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO

Equipo y material

- a) Cabina de flujo laminar
- b) Hot plate
- c) Tijera estéril
- d) Pinza estéril
- e) Bomba de vacío
- f) Gradilla
- g) Pipeteador
- h) 4 Tubos de vidrio
- i) Probetas estériles
- j) 2 Matraz de 250 mL
- k) 1 Matraz de 1000 mL
- l) 1 Kitasato
- m) Pipeta 10 mL
- n) Equipo para filtración por membrana.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0008	Página 5 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

Medio de Cultivo:

- a) Medio Tioglicolato
- b) Medio Caseína de soya digerido

III. PROCEDIMIENTO

De acuerdo al volumen de las muestras así se tomará la cantidad de líquido para la filtración. Se emplean 10 o 20 envases de muestra para cada caso y se siembra la membrana en tubos con 100 mL de medio de cultivo respectivamente.

A continuación se detallan los volúmenes requeridos para cada muestra:

Contenido del Envase	No de Envases	Volumen a tomar
Menos de 1 mL	20 – 40	El contenido total de cada envase
1 – 40 mL	20	La mitad del contenido, pero no menos de 20 mL
40 - 100 mL	20	20 mL
Más de 100 mL	10	10 % del contenido del envase, pero no menos de 20 mL

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 6 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

Para ejemplificar el procedimiento se tomarà una muestra de 20 envases que contienen 50 mL.

- 1) Utilizar 20 envases de muestra de 50 mL previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter 20 mL de cada uno de los frascos en un matraz de 1 litro.
- 4) Armar el equipo de filtración colocando asépticamente una membrana de 0.45 micras y sujetando el embudo al filtro con la pinza de sostén.
- 5) Tomar con pipeta 10 mL del contenido combinado de los 20 frascos y proceder a filtrarlo.
- 6) Extraer la membrana asépticamente con una pinza estéril.
- 7) Cortar la membrana por la mitad con una tijera estéril .

DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Colocar una porción de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Tioglicolato.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 30° - 35 °C por 7 días.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 7 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.
- 5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Colocar una sección de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Caseína de soya digerido.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 20° - 25 °C por 14 días.
- 4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.
- 5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0008	Página 8 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
- 2) Cuando no se observa crecimiento en los tubos de muestra significa que el producto es estéril. El tubo control en todos los casos debe ser negativo.
- 3) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis con el doble de muestra, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

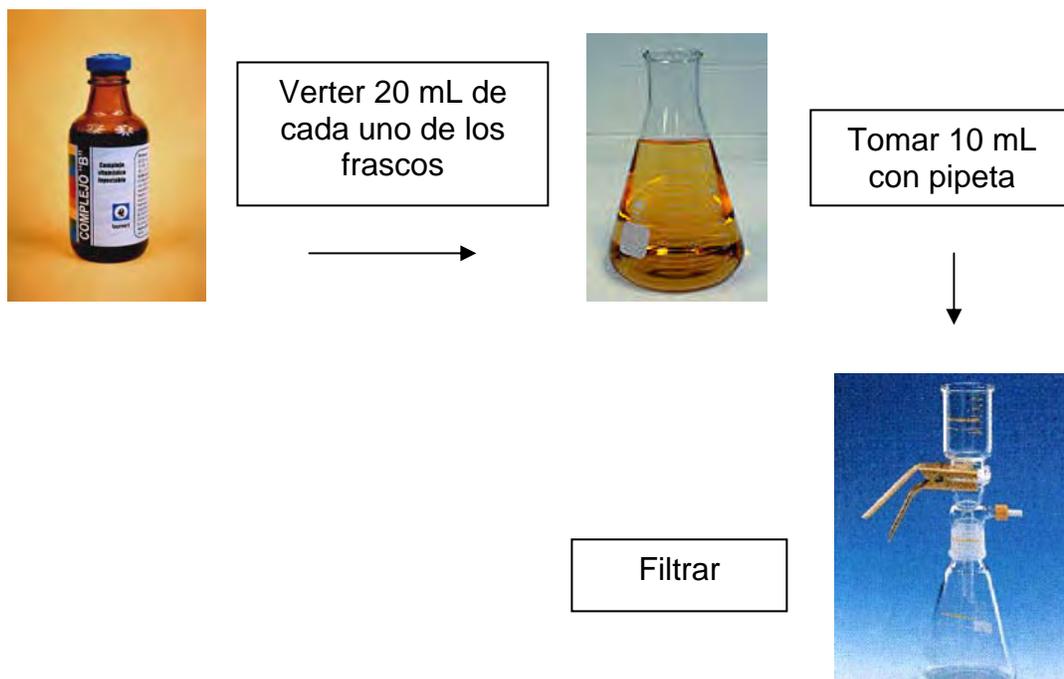
- 1) El equipo de filtración debe ser estéril
- 2) La membrana debe ser de 0.45 micras.
- 3) Los medios de cultivo a utilizar deben ser recientemente preparados y esterilizados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 9 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

- 4) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
- 5) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

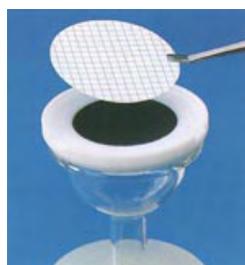
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 envases de 50 mL

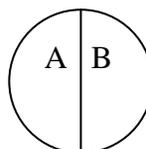


	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 10 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

Remover la membrana en forma aséptica



Cortar en dos partes con tijera estéril



A



100 ml Medio
Tioglicolato
(Bacterias)

Colocar las porciones A y
B de la membrana en
tubos

B



100 ml Medio
Caseína de soya
digerido
(Hongos y Levaduras)

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0008	Página 11 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá igual volumen de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos periódicamente. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Filtración por Membrana: www.servitel.es/ned/sarto/esp/f23e.htm

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0009	Página 1 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó	Autorizó	

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método indirecto o de filtración por membrana en muestras líquidas altamente viscosas miscibles en medio acuoso.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de inyectables líquidas altamente viscosas miscibles en medio acuoso.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- **Estéril**: libre de todo organismo vivo.

- **Filtración por membrana**: procedimiento mediante el cual la muestra soluble o solubilizada es filtrada a través de membranas de celulosa (0.45 micras), quedando retenidos los microorganismos en la membrana.

- **Bacterias**: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

- **Hongos**: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0009	Página 2 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0009	Página 3 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El empleo del método indirecto o de filtración por membrana para la determinación de bacterias y hongos en muestras altamente viscosas es realizado empleando dos sistemas filtrantes, lo cual facilita el proceso de filtrado.

II. EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

- a) Cabina de flujo laminar
- b) Incubadora con termómetro graduado

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0009	Página 4 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- c) Hot plate
- d) 2 Tijeras estériles
- e) 2 Pinzas estériles
- f) Bomba de vacío
- g) Gradilla
- h) 4 Tubos de vidrio estériles
- i) Probetas estériles
- j) 2 Matraz de 250 mL
- k) 1 Matraz de 1000 mL
- l) 2 Kitasato
- m) 2 Equipos para filtración por membrana (embudo, filtro y pinza de sostén).

Medio de Cultivo:

- a) Medio Tioglicolato
- b) Medio Caseína de soya digerido

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Utilizar 10 envases de muestra divididos en dos grupos de 5.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0009	Página 5 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 3) Armar los equipos de filtración colocando asépticamente una membrana de 0.45 micras y sujetando el embudo al filtro con la pinza de sostén.
- 4) Verter el contenido completo de los 5 frascos en cada uno de los sistemas filtrantes.
- 5) Extraer las membranas asépticamente con una pinza estéril.
- 6) Se empleará una membrana para determinar Bacterias y la otra para Hongos y Levaduras

DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Colocar una membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Tioglicolato.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 30° - 35 °C por 7 días.
- 4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0009	Página 6 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

1) Colocar una membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Caseína de soya digerido.

2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.

3) Incubar los tubos a 20° - 25 °C por 14 días.

4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.

5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

IV. CALCULOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0009	Página 7 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
- 2) Cuando no se observa crecimiento en los tubos de muestra significa que el producto es estéril. El tubo control en todos los casos debe ser negativo.
- 3) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis con el doble de muestra, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

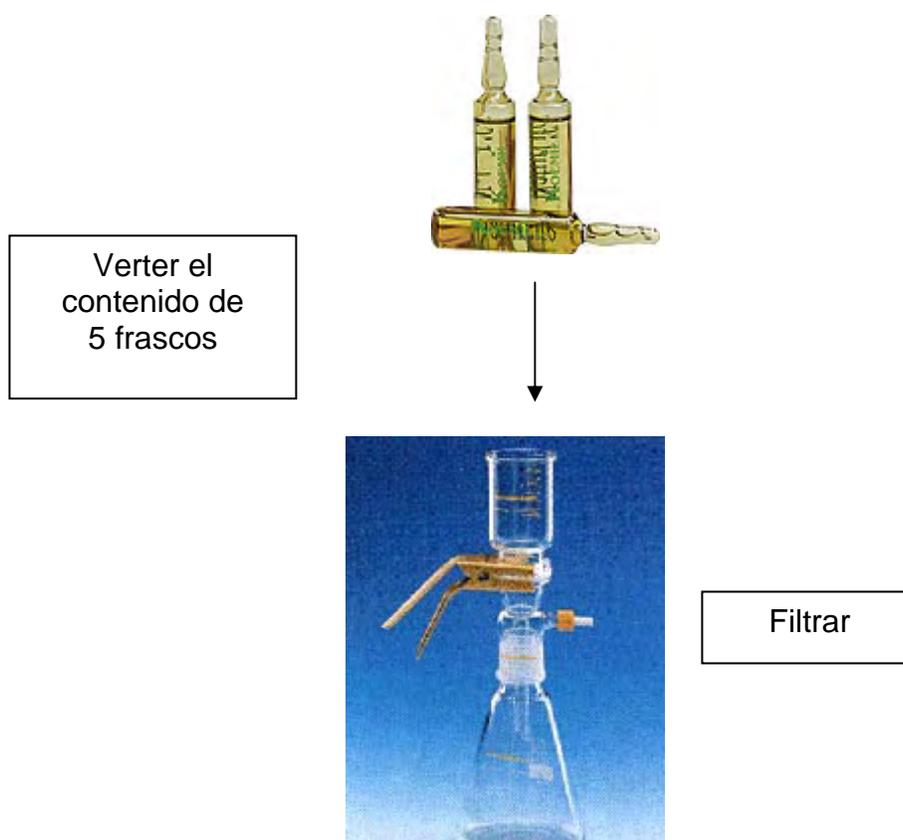
- 1) El equipo de filtración debe ser estéril
- 2) La membrana debe ser de 0.45 micras.
- 3) Los medios de cultivo a utilizar deben ser recientemente preparados y esterilizados.
- 4) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0009	Página 8 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

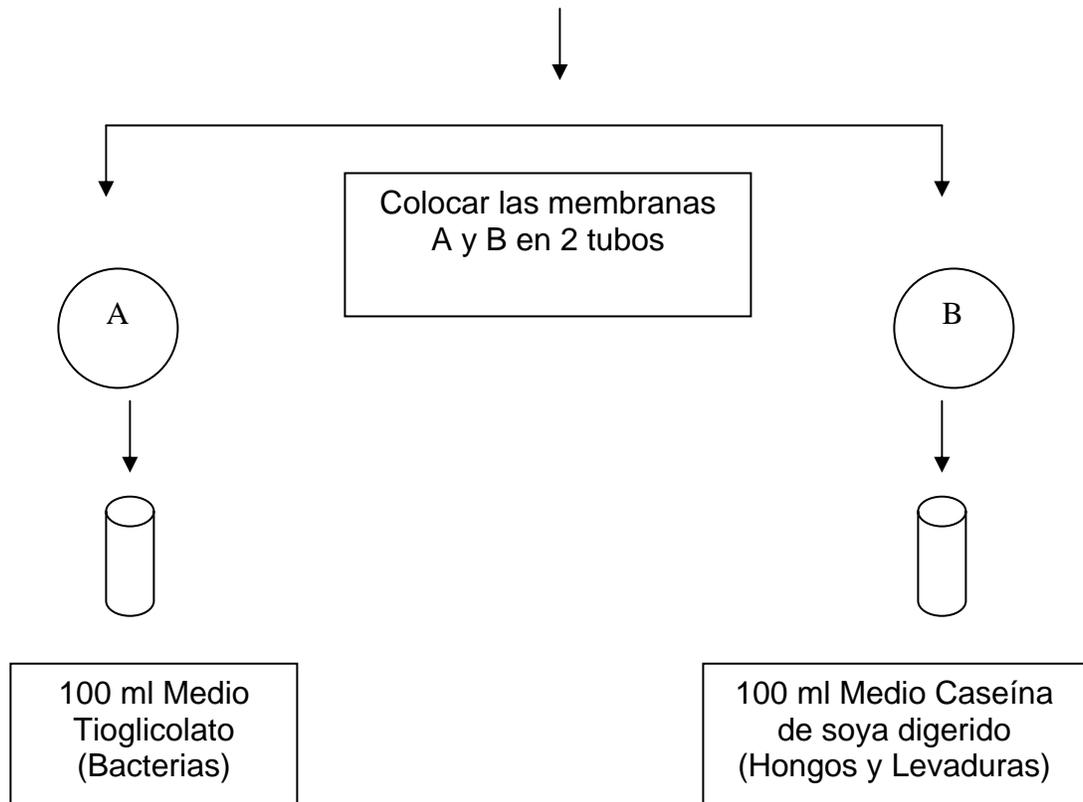
Seleccionar 10 envases y dividir en dos grupos de 5.

Se emplearán dos sistemas filtrantes y se procederá según el esquema:



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0009	Página 9 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

Remover las membranas en forma aséptica



	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0009	Página 10 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA:

En cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá igual volumen de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos periódicamente. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Filtración por Membrana: www.servitel.es/ned/sarto/esp/f23e.htm

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0010	Página 1 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método indirecto o de filtración por membrana en muestras líquidas con propiedades bacteriostáticas o fungistáticas.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de inyectables líquidas con propiedades bacteriostáticas o fungistáticas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

-**Estéril**: libre de todo organismo vivo.

-**Filtración por membrana**: procedimiento mediante el cual la muestra soluble o solubilizada es filtrada a través de membranas de celulosa (0.45 micras), quedando retenidos los microorganismos en la membrana.

-**Bacterias**: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

-**Hongos**: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0010	Página 2 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

-**Levaduras**: células micóticas sencillas, ovales a redondas que forman yemas para reproducirse.

-**Bacteriostático**: sustancia que tiene la propiedad de inhibir la multiplicación bacteriana.

-**Fungistático**: sustancia que tiene la propiedad de prevenir el crecimiento de hongos.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0010	Página 3 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El empleo del método de filtración por membrana para la evaluación de la esterilidad de muestras con propiedades bacteriostáticas o fungistáticas

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0010	Página 4 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

requiere de especial cuidado al momento de filtrar las muestras; ya que las membranas deben ser lavadas cuidadosamente con diferentes fluidos que inhiben la actividad bacteriostática o fungistática de los residuos de muestra adheridos a la membrana, los cuales pueden interferir con el crecimiento de posibles microorganismos contaminantes.

II. EQUIPOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- a) Cabina de flujo laminar
- b) Incubadora con termómetro graduado
- c) Hot plate
- d) Tijera estéril
- e) Pinza estéril
- f) Bomba de vacío
- g) Gradilla
- h) Pipeteador
- i) 4 Tubos de vidrio
- j) Probetas estériles
- k) 2 Matraz de 250 mL

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0010	Página 5 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- l) 1 Matraz de 1000 mL
- m) 1 Kitasato
- n) Pipeta 10 mL
- o) Equipo para filtración por membrana.

Medios de Cultivo

- a) Medio Tioglicolato
- b) Medio Caseína de soya digerido

III. PROCEDIMIENTO

De acuerdo al volumen de las muestras así se tomará la cantidad de líquido para la filtración. Se emplean 10 o 20 envases de muestra para cada caso y se siembra la membrana en tubos con 100 mL de medio de cultivo respectivamente.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0010	Página 6 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

A continuación se detallan los volúmenes requeridos para cada muestra:

Contenido del Envase	No de Envases	Volumen a tomar
Menos de 1 mL	20 - 40	El contenido total de cada envase
1 – 40 mL	20	La mitad del contenido, pero no menos de 20 mL
40 - 100 mL	20	20 mL
Más de 100 mL	10	10 % del contenido del envase, pero no menos de 20 mL

Para ejemplificar el procedimiento se tomará una muestra de 20 envases que contienen 50 mL.

- 1) Utilizar 20 envases de muestra de 50 mL previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
- 3) Verter 20 mL de cada frasco en un matraz de 1 litro.
- 4) Armar el equipo de filtración colocando asépticamente una membrana de 0.45 micras y sujetando el embudo al filtro con la pinza de sostén.
- 5) Tomar con pipeta 10 mL del contenido combinado de los 20 frascos y proceder a filtrarlo.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0010	Página 7 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 6) Lavar la membrana con tres porciones de 100 mL cada una de Fluido A (1.0g Digerido péptido de tejido animal, agua destilada csp 1 litro, pH 7.1 \pm 0.2) previamente esterilizado.
- 7) Si la muestra contiene en su formula Lecitina o aceite, lavar la membrana con 3 porciones de 100 mL cada una de Fluido D (Fluido A 1000 ml, Polisorbato y Tween 80, pH 7.1 \pm 0.2).
- 8) Extraer la membrana asépticamente con una pinza estéril.
- 9) Cortar la membrana en dos partes con una tijera estéril.

DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Colocar una porción de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Tioglicolato.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 30° - 35 °C por 7 días.
- 4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		MI - 0010	8 de 12
		Vigente a partir de:		
Elaboró		Revisó		Autorizó

- 5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Colocar la otra mitad de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Caseína de soya digerido.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 20° - 25 °C por 14 días.
- 4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.
- 5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

IV. CALCULOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0010	Página 9 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
- 2) Cuando no se observa crecimiento en los tubos de muestra significa que el producto es estéril. El tubo control en todos los casos debe ser negativo.
- 3) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis con el doble de muestra, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) El equipo de filtración debe ser estéril
- 2) La membrana debe ser de 0.45 micras.
- 3) Los medios de cultivo a utilizar deben ser recientemente preparados y esterilizados.
- 4) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0010	Página 10 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

- 5) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 envases de 50 mL



Verter 20 mL de
cada envase en
un matraz



Tomar con pipeta
10 mL de la
mezcla y filtrar.

Enjuagar la membrana
con 3 porciones de 100
mL cada una de Fluido A
o Fluido D según el caso.

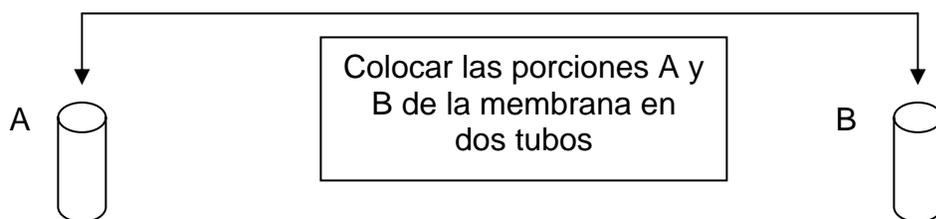
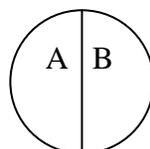


	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0010	Página 11 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

Remover asépticamente la membrana



Cortar en dos mitades con tijera estéril



100 ml Medio
Tioglicolato
(Bacterias)

100 ml Medio Caseína
de soya digerido
(Hongos y Levaduras)

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0010	Página 12 de 12
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

NOTA:

- Si se emplean dos sistemas filtrantes, utilizar una membrana completa para el tubo con medio Tioglicolato y la otra membrana completa para el tubo con medio Caseína de soya digerido.
- En cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá igual volumen de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.
Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras

Observar los tubos periódicamente. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0011	Página 1 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método indirecto o de filtración por membrana en muestras líquidas oleosas.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de inyectables líquidas oleosas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- **Estéril**: libre de todo organismo vivo.

- **Filtración por membrana**: procedimiento mediante el cual la muestra soluble o solubilizada es filtrada a través de membranas de celulosa (0.45 micras), quedando retenidos los microorganismos en la membrana.

- **Bacterias**: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

- **Hongos**: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0011	Página 2 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

-Levaduras: células micóticas sencillas, ovales a redondas que forman yemas para reproducirse.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0011	Página 3 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El empleo del método de filtración por membrana para la determinación de bacterias y hongos en muestras oleosas puede realizarse empleando 20 envases de muestra y un solo sistema filtrante, en el caso que el contenido del envase sea muy pequeño se emplean 40 envases y dos sistemas filtrantes.

II. EQUIPOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- a) Cabina de flujo laminar
- b) Incubadora con termómetro graduado

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0011	Página 4 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

- c) Hot plate
- d) Pinzas estériles
- e) Bomba de vacío
- f) Gradilla
- g) Tijeras
- h) 4 Tubos de vidrio
- i) Probetas estériles
- j) 2 Matraz de 250 mL
- k) 1 Matraz de 1000 mL
- l) Kitasato
- m) Equipos para filtración por membrana.

Medios de Cultivo

- a) Medio Tioglicolato
- b) Medio Caseína de soya digerido

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Utilizar 20 envases de muestra previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0011	Página 5 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

- 3) Armar el equipo de filtración colocando asépticamente una membrana de 0.45 micras y sujetando el embudo al filtro con la pinza de sostén.
- 4) Verter el contenido completo de los 20 frascos en el sistema filtrante.
- 5) Extraer la membrana asépticamente con una pinza estéril.
- 6) Recortar la membrana en dos mitades con una tijera estéril.

DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Colocar la parte A de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Tioglicolato.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 30° - 35 °C por 7 días.
- 4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.
- 5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0011	Página 6 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- 1) Colocar la porción B de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Caseína de soya digerido.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 20° - 25 °C por 14 días.
- 4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.
- 5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0011	Página 7 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

- 2) Cuando no se observa crecimiento en los tubos de muestra significa que el producto es estéril. El tubo control en todos los casos debe ser negativo.
- 3) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis con el doble de muestra, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

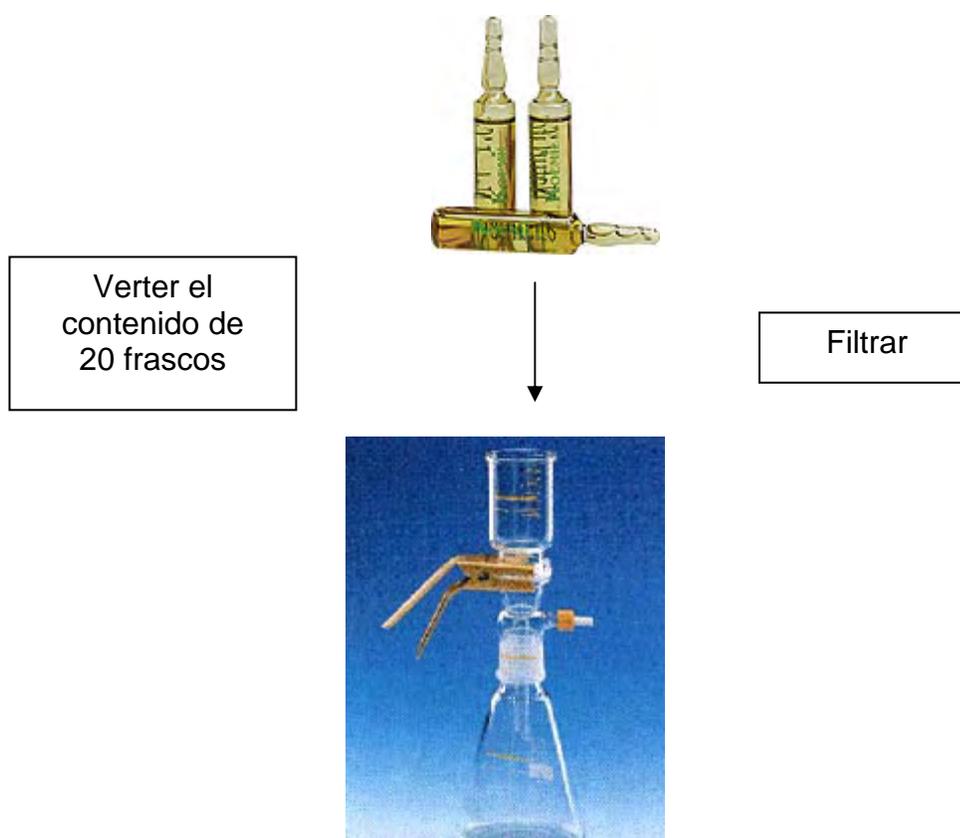
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) El equipo de filtración debe ser estéril
- 2) Los medios de cultivo a utilizar deben ser recientemente preparados y esterilizados.
- 3) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0011	Página 8 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

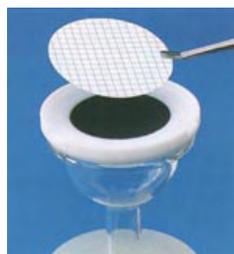
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 envases

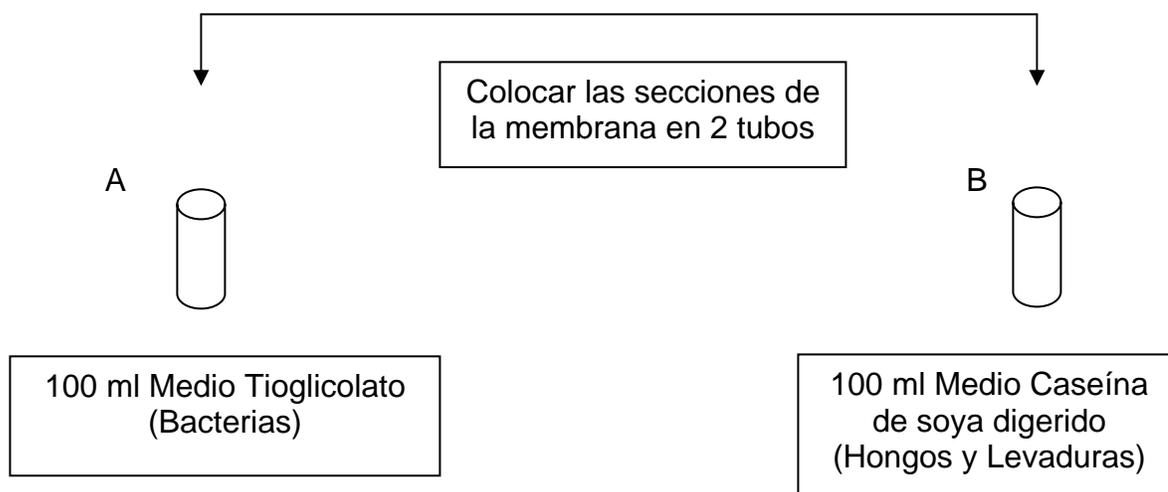


	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0011	Página 9 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

Remover la membrana
en forma aséptica



Recortar la membrana en dos mitades



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0011	Página 10 de 10
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA:

En cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá igual volumen de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos periódicamente. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Filtración por Membrana: www.servitel.es/ned/sarto/esp/f23e.htm

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 1 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Bacterias, Hongos y Levaduras por el método indirecto o de filtración por membrana en muestras de antibióticos liofilizados.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a medicamentos antibióticos liofilizados.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

-Estéril: libre de todo organismo vivo.

-Filtración por membrana: procedimiento mediante el cual la muestra soluble o solubilizada es filtrada a través de membranas de celulosa (0.45 micras), quedando retenidos los microorganismos en la membrana.

-Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

-Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

-Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 2 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

-Polvo Liofilizado: medicamento al cual se le ha eliminado el agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 3 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

La prueba de esterilidad en antibióticos por el método directo es una técnica muy usada debido a que es más rápida y con menor costo que el método directo. Dichas pruebas son aplicadas también a los antibióticos en forma de polvos liofilizados. El número de muestras a tomar se determina por la presentación del producto: si la muestra contiene 300 mg o menos tomar el contenido completo de 20 envases, si contiene más de 300 mg, tomar aproximadamente 300 mg de cada uno de 20 envases.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 4 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

II. EQUIPOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- a) Cabina de flujo laminar
- b) Incubadora con termómetro graduado
- c) Hot plate
- d) Tijera estéril
- e) Pinza estéril
- f) Bomba de vacío
- g) Gradilla
- h) Pipeteador
- i) 4 Tubos de vidrio estériles
- j) Probetas estériles
- k) 2 Matraz de 250 mL
- l) 1 Matraz de 500 mL
- m) 1 Kitasato
- n) Pipeta 10 mL
- o) Equipo para filtración por membrana.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 5 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

Medios de Cultivo:

- a) Diluyente A (Digerido péptido de tejido animal 1.0g / agua csp. 1 litro)
- b) Medio MA (Tioglicolato pH 7.1)
- c) Medio ME (Digerido pancreático de caseína de soya)

III. PROCEDIMIENTO

De acuerdo al volumen de las muestras así se tomarà la cantidad de líquido para la filtración. Se emplean 20 envases de muestra para cada caso y se siembra la membrana en tubos con 100 mL de medio de cultivo respectivamente.

A continuación se detallan la cantidad de muestra a tomar para cada caso:

Contenido del Envase	No de Envases	Cantidad a tomar
Menos de 50 mg	20	Todo el contenido
50 - 300 mg	20	La mitad del contenido del envase, pero no menos de 50 mg
300 mg – 5 g	20	150 mg

Para ejemplificar el procedimiento se tomarà una muestra de 20 envases que contienen 50 mg de polvo liofilizado.

- 1) Utilizar 20 envases de muestra de previamente desinfectados.
- 2) Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0012	Página 6 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

- 3) Combinar el contenido de los 20 frascos en un matraz de 500 mL que contiene 200 mL de Diluyente A.
- 4) Agitar suavemente hasta disolver el sólido, en caso de no disolverse totalmente se aumenta el diluyente hasta 400 mL.
- 5) Armar el equipo de filtración colocando asépticamente la membrana y sujetando el embudo al filtro con la pinza de sostén.
- 6) Verter el contenido del matraz en el embudo y proceder a filtrar.
- 7) Lavar el filtro con 3 porciones de 100 mL de Diluyente A, para eliminar los residuos de tipo bacteriostático o fungistático.
- 8) Extraer la membrana asépticamente con una pinza estéril.
- 9) Cortar la membrana en dos mitades con una tijera estéril.

DETERMINACION DE BACTERIAS

- 1) Colocar una parte de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de Medio MA.
- 2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
- 3) Incubar los tubos a 30° - 35 °C por 7 días.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 7 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.

5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

1) Colocar la otra mitad de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de Medio ME.

2) Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.

3) Incubar los tubos a 20° - 25 °C por 14 días.

4) Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.

5) Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 8 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

- 1) Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
- 2) Cuando no se observa crecimiento en los tubos de muestra significa que el producto es estéril. El tubo control en todos los casos debe ser negativo.
- 3) Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis con el doble de muestra, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) El equipo de filtración debe ser estéril
- 2) La membrana debe ser de 0.45 micras.
- 3) Los medios de cultivo a utilizar deben ser recientemente preparados y esterilizados.

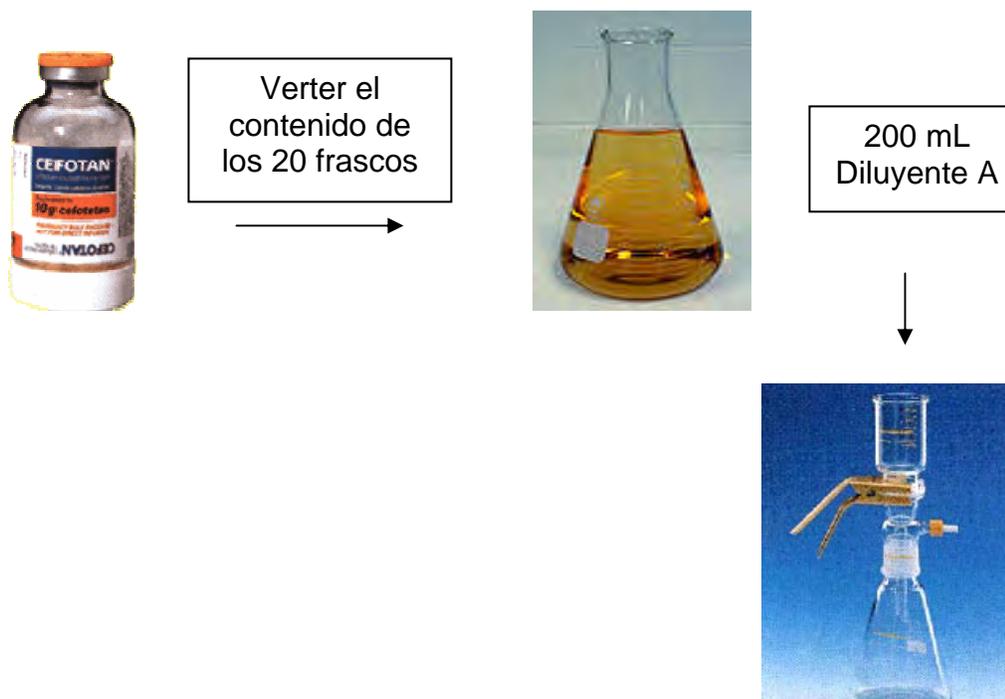
	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 9 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

4) Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.

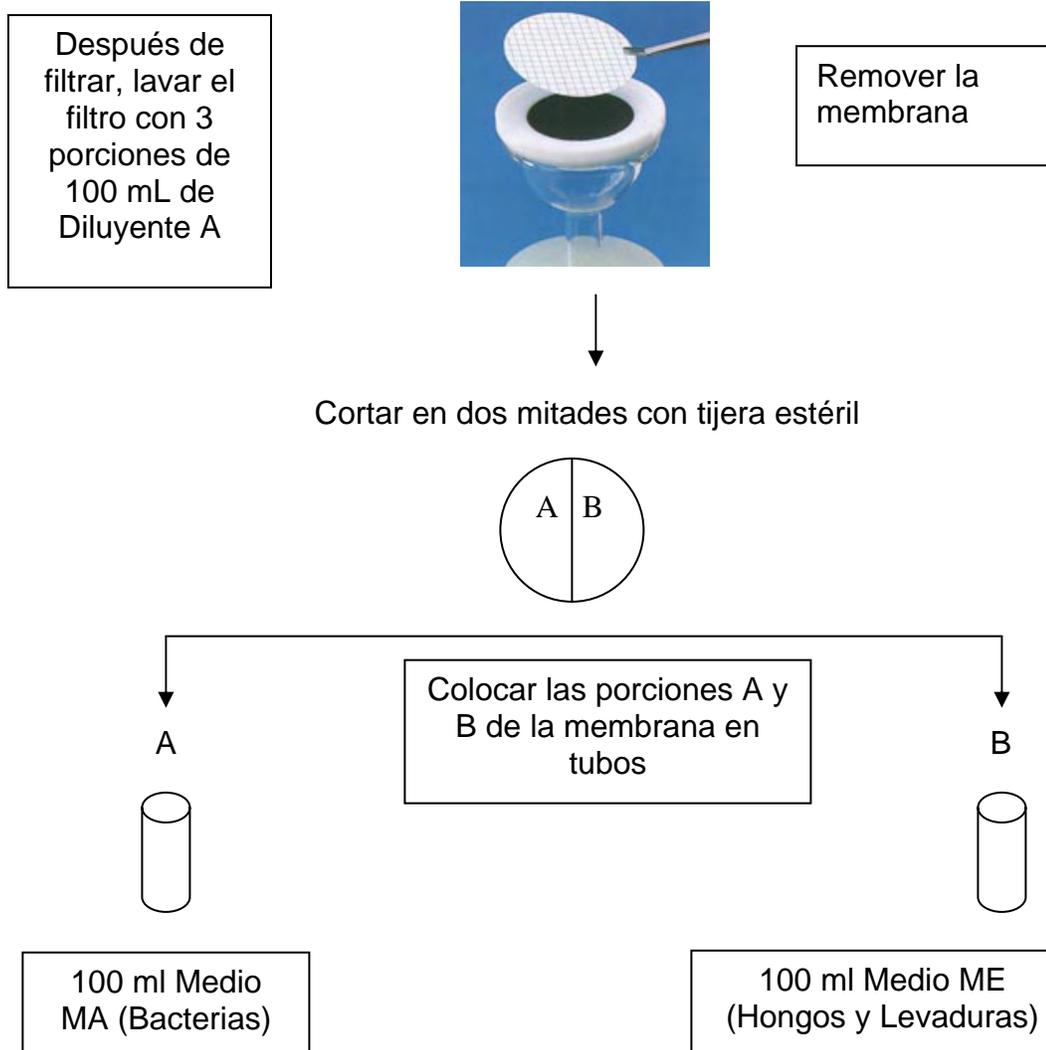
5) Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 20 envases conteniendo 50 mg de polvo liofilizado.



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 10 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0012	Página 11 de 11
	PRUEBA DE ESTERILIDAD INYECTABLES MÉTODO FILTRACION POR MEMBRANA		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá igual volumen de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 7 a 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos periódicamente. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Pharmacopeia Convention, apartado <71>, año 2006.
- Filtración por Membrana: www.servitel.es/ned/sarto/esp/f23e.htm

I. ANEXOS

No aplica.

PRUEBA DE PIRÓGENOS

	Procedimiento Normalizado		Código: MI – 0013	Página 1 de 10
	PRUEBA DE PIRÓGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de pirógenos por medio del método biológico utilizando conejos.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a toda muestra de medicamentos parenterales, ya sean líquidos o polvos liofilizados listos para reconstituir.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- **Parenterales:** son preparaciones destinadas para ser administradas a través de la piel o los tejidos incluyéndose también el canal alimentario, se manera que las sustancias activas que estas contienen son administradas usando gravedad o fuerza, directamente en un vaso sanguíneo, órgano, tejido o lesión.
- **Polvo Liofilizado:** medicamento al cual se le ha eliminado el agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.
- **Pirógenos:** son productos del metabolismo microbiano, en donde las sustancias más potentes son las endotoxinas, las cuales son constituyentes de la pared celular de las bacterias Gramnegativas y los hongos.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 2 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

- **Endotoxinas:** son polisacáridos de alto peso molecular aliados en la porción lipídica de la pared celular de las bacterias Gramnegativas y los hongos, la cual es la responsable de la acción biológica desencadenando entre otros los procesos febriles.

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
2. Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 3 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO			
Elaboró		Revisó		Autorizó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

La determinación de pirógenos por el método biológico se basa en la respuesta biológica de los animales de laboratorio ante la presencia de agentes pirógenos. Debido a que los pirógenos son fracciones moleculares es bastante difícil eliminarlos o erradicarlos, provocando reacciones febriles en el organismo cuando son administrados por vía parenteral o endovenosa.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 4 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

El método biológico implica el uso de conejos de la cepa neocelandesa o similares, adultos jóvenes, sanos, de peso no menor a 1.5 – 2 Kg, machos, ya que las hembras pueden presentar problemas en la interpretación.

Los conejos deben mantener su peso con una dieta libre de antibióticos durante la semana anterior a la prueba, estos deben estar en jaulas individuales con temperatura uniforme 20° - 23° C, sin ruidos o factores que los exciten.

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Termómetro clínico.
- b) Tijeras
- c) Pinzas
- d) Algodón
- e) Rasuradora
- f) Jeringas de tuberculina
- g) Baño María
- h) Beaker 50 mL

Reactivos:

- a) Alcohol 70 %

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 5 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó

III. PROCEDIMIENTO

1. Determinar la temperatura control de diferentes conejos insertando el termómetro en el recto cada 30 minutos, a una profundidad no menor de 7.5 cm, tomando la temperatura después de transcurrido el tiempo necesario para que se tranquilice el animal y el termómetro alcance su lectura correcta.
2. Tomar las lecturas hasta que la variación no sea mayor de 0.2° C entre una y otra. Ésta será la temperatura control
3. Deben utilizarse únicamente conejos cuya temperatura control no varíe en más de 1° C uno del otro; no deben usarse animales con temperatura superior a 39.8°C o menor a 38.9°C.
4. Seleccionar 3 conejos.
5. Rasurar y desinfectar con alcohol 70 % la oreja de cada animal.
6. Calentar la muestra en un baño maría a 37 °C \pm 2.
7. Inyectar lentamente a cada conejo en la vena marginal de la oreja con 10 mL de la solución a ensayar por Kg de peso. La inyección debe efectuarse dentro de los 30 minutos posteriores a la toma de la temperatura control

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 6 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO			
Elaboró		Revisó	Autorizó	

8. Debe efectuarse la inyección en no más de 10 minutos.
9. Tomar la temperatura de los animales 1,2 y 3 horas después de la aplicación de la inyección.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

1. Si ningún conejo muestra un incremento individual de 0.5°C o más sobre su respectiva temperatura de control; y si la suma del incremento mayor de los tres conejos no excede de 1.1°C, la muestra cumple con los requerimientos para ausencia de pirógenos.
2. Si uno o dos conejos muestran un aumento de temperatura de 0.5°C o más, o si la suma del incremento mayor de los tres conejos excede de 1.1°C repetir la prueba usando cinco conejos más.
3. Si no más de tres de los ocho animales muestran una elevación de temperatura de 0.5°C, y si la suma de los incrementos mayores de los ocho conejos no es superior a 3.3°C, la muestra cumple con los requerimientos para ausencia de pirógenos.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 7 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

NOTA : después de usar los especímenes para una prueba de pirógenos, debe transcurrir un periodo no menor a 72 horas antes de volverlos a utilizar, si la prueba fue negativa.

Si la prueba fue positiva, deberán esperarse 2 semanas para volverlos a utilizar.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Los especímenes usados en la prueba de pirógenos deben ser machos jóvenes con un peso no menor a 1.5 Kg.
2. Los conejos deben mantener su peso con una dieta libre de antibióticos durante la semana anterior a la prueba.
3. Antes de utilizar los conejos por primera vez, o cuando no se han usado por más de 2 semanas, controlarles la temperatura durante 3 días consecutivos antes de la prueba, realizando todos los pasos de una determinación de pirógenos pero omitiendo la inyección.
4. Diez horas antes de la prueba retirar el alimento, permitiendo únicamente el acceso al agua. Aislar los conejos que se van a emplear en jaulas individuales, evitando el ruido y cualquier otro factor que los excite.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 8 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

5. Deben utilizarse únicamente conejos cuya temperatura control no varíe en más de 1° C uno del otro; no deben usarse animales con temperatura superior a 39.8°C o menor a 38.9°C.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 3 conejos machos jóvenes, con peso no menor a 1.5 Kg.



Tomar la temperatura por vía rectal a los 3 conejos para establecer la temperatura control, la cual no debe variar en más de 1°C de un conejo a otro. La temperatura control debe oscilar entre 38.9°C – 39.8°C.



Rasurar la oreja de los conejos y desinfectar con alcohol 70 %.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0013	Página 9 de 10
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

Calentar la muestra
en baño maría a
 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$



Inyectar lentamente
a cada uno de los
conejos en la vena
marginal de la oreja
con 10 cc de la
muestra por cada
Kg de peso.
La inyección no
debe durar más de
10 minutos.

NOTA: inyectar a los animales dentro de los 30 minutos posteriores a la toma de la temperatura control.

Registrar la variación de las temperaturas:

Parámetros	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3
Peso			
Temperatura Control			
Dosis Administrada			
Temperatura en 1 hora			
Temperatura en 2 horas			
Temperatura en 3 horas			

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOLÓGICO		MI - 0013	10 de 10
Vigente a partir de:				
Elaboró	Revisó	Autorizó		

H. BIBLIOGRAFIA

Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, primera edición, 1989.

Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, USA, año 2006.

Norma Mexicana, NMX-BD-006 – 1990.

I. ANEXOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 1 de 12
	PRUEBA DE PIRÓGENOS MÉTODO BIOQUIMICO			
Elaboró	Revisó	Autorizó		

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de pirógenos por medio del Método Bioquímico o LAL (Lymulus ameocito lisado).

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a toda muestra de medicamentos parenterales, ya sean líquidos o polvos liofilizados listos para reconstituir.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- **Parenterales:** son preparaciones destinadas para ser administradas a través de la piel o los tejidos incluyéndose también el canal alimentario, se manera que las sustancias activas que estas contienen son administradas usando gravedad o fuerza, directamente en un vaso sanguíneo, órgano, tejido o lesión.
- **Polvo Liofilizado:** medicamento al cual se le ha eliminado el agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.
- **Pirógenos:** son productos del metabolismo microbiano, en donde las sustancias más potentes son las endotoxinas, las cuales son constituyentes de la pared celular de las bacterias Gramnegativas y los hongos.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 2 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

- **Endotoxinas:** son polisacáridos de alto peso molecular alojados en la porción lipídica de la pared celular de las bacterias Gramnegativas y los hongos, la cual es la responsable de la acción biológica desencadenando entre otros los procesos febriles.

- **Lymulus amebocito lisado:** es un extracto acuoso de las células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Lymulus polyphemus*).

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
2. Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 3 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO:

I- INTRODUCCION:

La determinación de pirógenos por el método bioquímico, es más rápida, sensible y menos cara que el método biológico. La prueba se basa en la coagulación de los componentes de la sangre de *Lymulus* (amebocitos), la cual es iniciada por un componente estructural único de la pared celular bacteriano denominado endotoxina o lipopolisacárido. La formación del coágulo se debe a una cascada de pasos de activación enzimática, la cual culmina en una interacción iónica que forma la matriz del gel.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 5 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

Para llevar a cabo la prueba de pirógenos por el método LAL es necesario preparar controles positivos y controles negativos con la finalidad de detectar en forma clara y precisa un resultado positivo de presencia de pirógenos en una muestra. Esto se debe a que algunas veces las muestras tienden a formar flóculos que se rompen fácilmente al invertir el tubo de prueba, lo cual puede dar lugar a resultados falso – positivos.

NOTA: preparar 3 controles negativos, un control positivo y el producto a ensayar se hace pro triplicado.

PREPARACION DE CONTROL POSITIVO

1. Preparar una suspensión de *Pseudomona aeruginosa* ATCC y colocar una gota en 2 tubos de hemólisis previamente esterilizados, esterilizar a 180°C por 3 horas y enfriar.
2. Agregar 1 mL de agua estéril libre de pirógenos por las paredes de los tubos y homogenizar.
3. Tomar por duplicado 0.2 mL de la solución anterior y agregar en dos viales que contienen LAL liofilizado. Mezclar suavemente para incorporar.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 6 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

4. Incubar a 37°C por una hora y observar la formación del coágulo, invirtiéndolo rápidamente a 180°. El coágulo es firme y no se rompe.
5. Si se cuenta con estándar de endotoxina, preparar diluciones de acuerdo a la sensibilidad del LAL con el que se cuenta (0.03 – 0.5 UE/mL); tomar 0.2 mL de esta dilución y agregar en el vial del LAL liofilizado, incubar a 37°C por una hora y observar el coágulo formado.

PREPARACION DE CONTROL NEGATIVO

1. Colocar por triplicado 0.2 mL de agua destilada libre de pirógenos en viales que contienen LAL liofilizado, mezclar suavemente para incorporar.
2. Incubar a 37°C por una hora. No debe formarse coágulo.

PROCEDIMIENTO PARA LAS MUESTRAS

1. Agregar 0.2 mL de la muestra a ensayar en un vial que contiene LAL liofilizado.
2. Una vez incorporada la solución se agita el vial en forma de ocho.
3. Incubar inmediatamente en un baño de agua a 37°C por 60 ± 2 minutos.
4. Pasado el periodo de incubación tomar el vial cuidadosamente e invertir a 180° en un solo movimiento uniforme.

	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 7 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

1. Si después de la hora de incubación se ha formado un coagulo y este permanece integro en el fondo del tubo después de invertirlo 180°, la prueba es positiva e indica la existencia de pirógenos en la muestra.
2. La prueba es negativa cuando al ser invertido el tubo 180° el coagulo se colapsa o se rompe. aun cuando este se halla formado.

NOTA: la reacción inicia cuando se añade la muestra a LAL, pero no procede a una velocidad óptima hasta que alcanza los 37°C.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

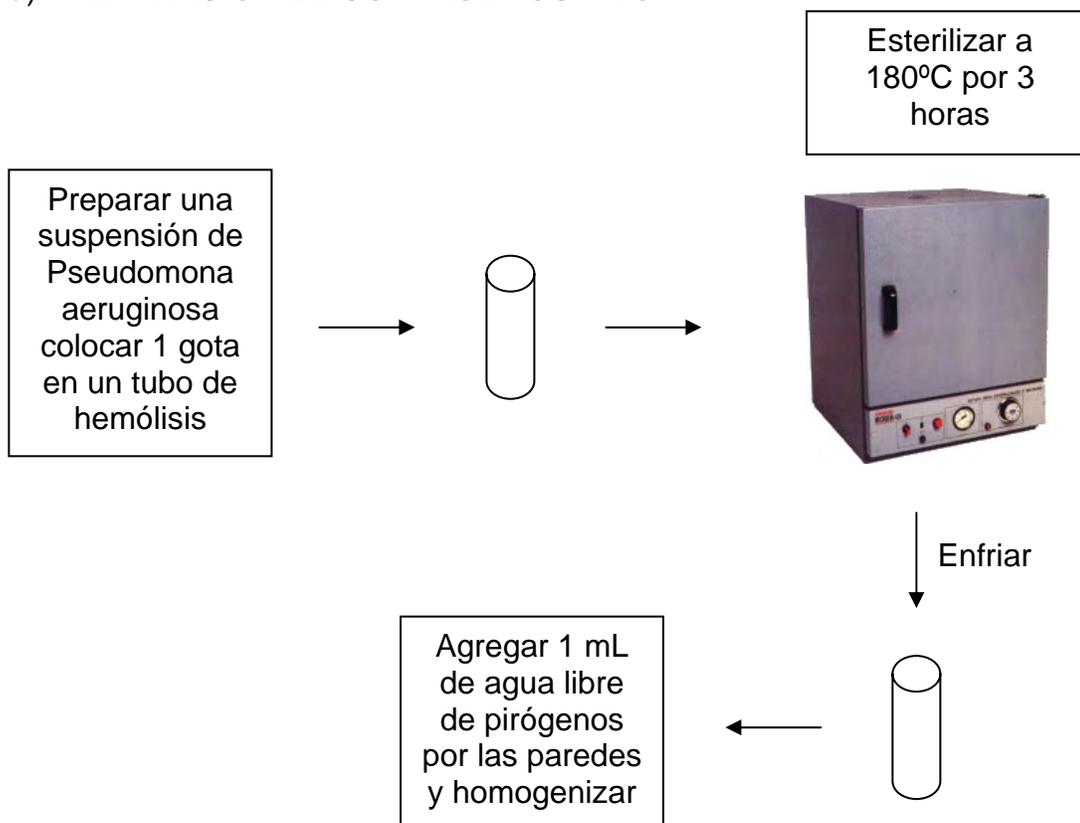
1. Los viales no deben moverse durante el período de incubación, ya que la formación del coágulo es una reacción delicada puede ser irreversiblemente terminada si los tubos son manipulados, agitados o si sufren algún tipo de vibración.
2. No deben secarse o golpearse los tubos contra los lados del soporte en el baño maría.

	Procedimiento Normalizado	Código: MI - 0014	Página 8 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:
Elaboró	Revisó	Autorizó	

3. No debe interrumpirse el procedimiento de inversión del tubo a menos que sea obvio que el coágulo no se ha formado.

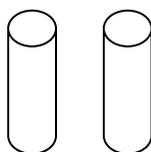
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

a) PREPARACION DE CONTROL POSITIVO



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 9 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

Tomar por duplicado
0.2 mL de la
solución y agregar
en los viales que
contienen LAL
liofilizado

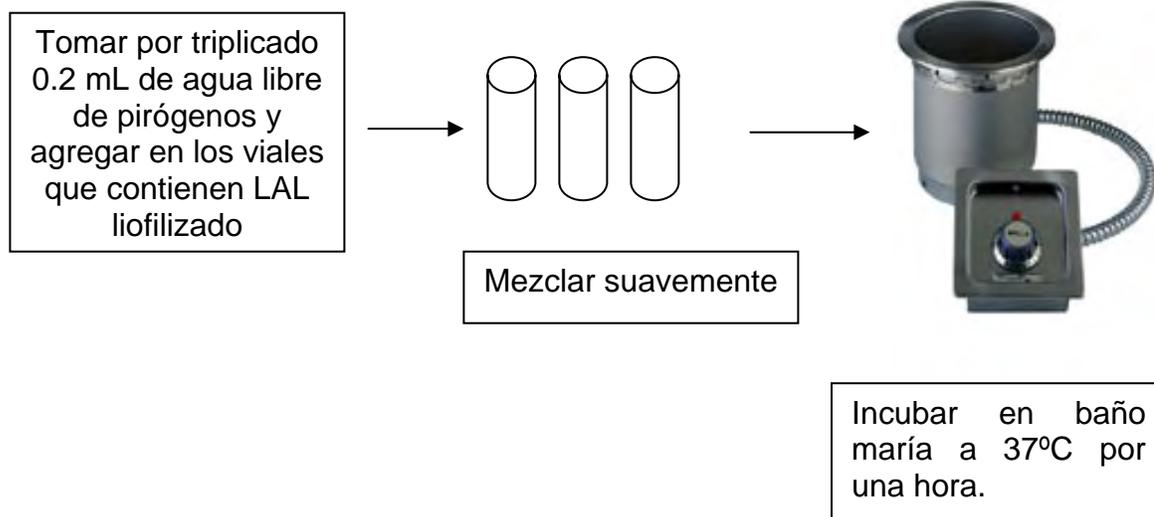


Mezclar suavemente

Incubar en baño
maría a 37°C por
una hora.

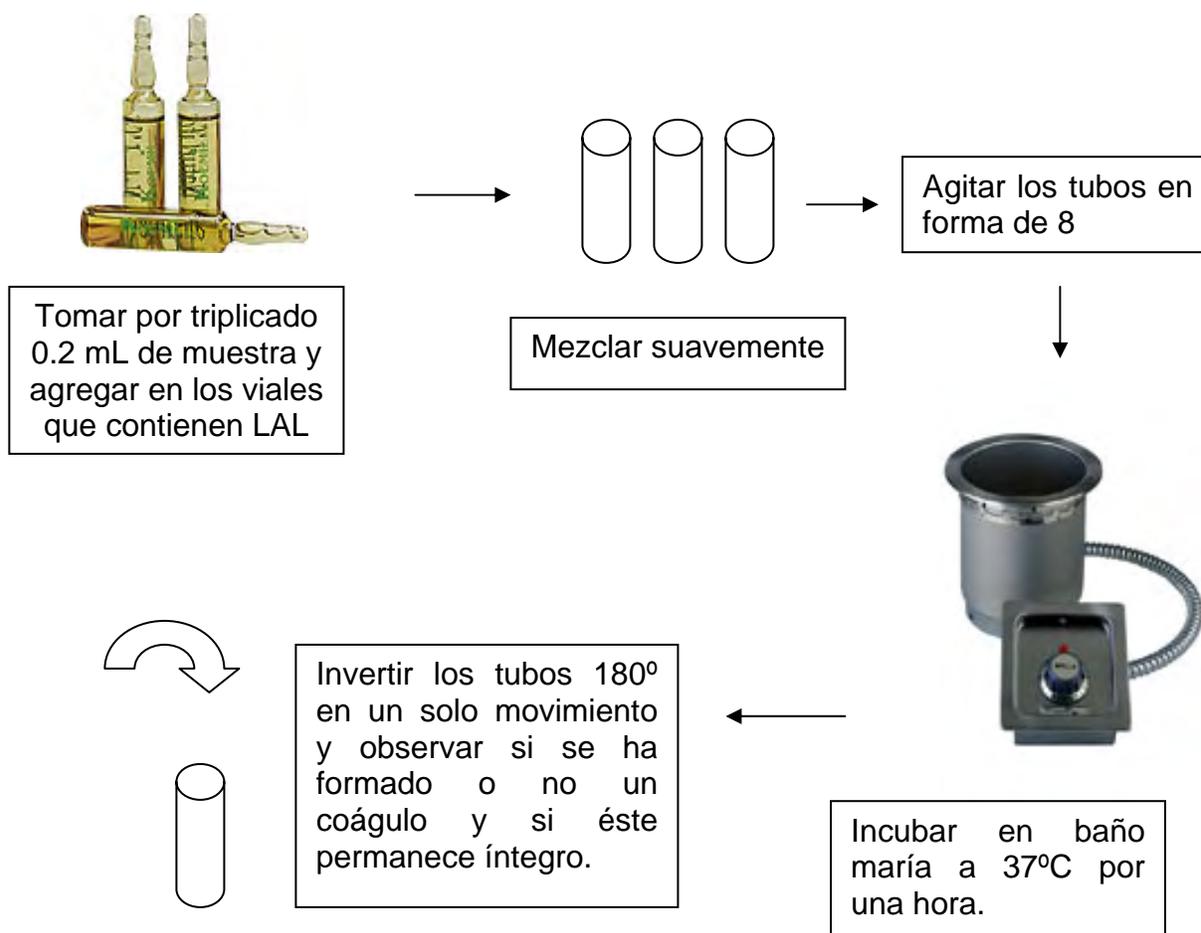
	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 10 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

b) PREPARACION DE CONTROL NEGATIVO



	Procedimiento Normalizado	Código: MI - 0014	Página 11 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:
Elaboró	Revisó	Autorizó	

c) MUESTRA



	Procedimiento Normalizado		Código: MI - 0014	Página 12 de 12
	PRUEBA DE PIROGENOS MÉTODO BIOQUIMICO		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Seguridad en la Calidad, primera edición, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, USA, año 2006.
- Norma Mexicana, NMX-BD-006 – 1990.

I. ANEXOS

No aplica.

VACUNAS

PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 001	Página 1 de 11
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para determinar la esterilidad de las vacunas.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a toda muestra de vacunas con excepción de las vacuna contra la viruela y la vacuna BCG.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Vacunas: son preparaciones hechas a base de microorganismos muertos o atenuados causantes de enfermedades. Crean anticuerpos contra la enfermedad que el microorganismo produce cuando son administradas al paciente.

Estéril: libre de todo organismo vivo.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana		MV - 001	2 de 11
			Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
2. Los métodos y procedimientos empleados son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además confidencial.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana		MV - 001	3 de 11
			Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

G. DESARROLLO:

I- INTRODUCCION:

Con excepción de las vacunas contra la viruela y la vacuna BCG, todas las vacunas deben ser bacteriológicamente y micológicamente estériles. En cada lote de un producto el número de muestras depende del tamaño del lote y está sujeto a regulaciones farmacopéicas. El método más usado para este caso es la filtración por membrana, la cual permite la filtración de volúmenes grandes de muestra sin necesidad de dilución. Siendo capaz de detectar bacterias aerobias, anaerobias y hongos.

II- EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS:

Equipo y Utensilios

- a) Incubadora
- b) Cabina de flujo laminar
- c) Hot plate
- d) Tijeras
- e) Pinzas
- f) Bomba de vacío
- g) Gradilla

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 001	Página 4 de 11	
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana			Vigente a partir de:	
	Elaboró		Revisó		Autorizó

- h) Pipeteador
- i) 4 Tubos de vidrio
- j) Probetas estériles
- k) 2 Matraz 250 mL
- l) 1 Matraz de 125 mL
- m) 1 Kitasato
- n) Pipeta 10 mL
- o) Equipo para filtración por membrana.

Medios de Cultivo:

- a) Medio Tioglicolato
- b) Medio Caseína de soya digerido

III. PROCEDIMIENTO

De acuerdo al volumen de las muestras así se tomarà la cantidad de líquido para la filtración. Se emplean 10 o 20 envases de muestra para cada caso y se siembra la membrana en tubos con 100 mL de medio de cultivo respectivamente.

	Procedimiento Normalizado		Código:	Página
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana		MV - 001	5 de 11
			Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

A continuación se detallan los volúmenes requeridos para cada muestra:

Contenido del Envase	No de Envases	Volumen a tomar
1 mL o menor	20 - 40	Todo el contenido
1 ml – 5 mL	20	Todo el contenido

Para ejemplificar el procedimiento se tomarà una muestra de 40 envases que contienen 1 mL.

1. Utilizar 40 envases de muestra de 1 mL previamente desinfectados.
2. Destapar cada envase asépticamente bajo la cabina de flujo laminar.
3. Combinar el contenido de los 40 frascos en un matraz erlenmeyer de 125 mL.
4. Armar el equipo de filtración colocando asépticamente una membrana de 0.45 micras y sujetando el embudo al filtro con la pinza de sostén.
5. Filtrar el contenido combinado de los 40 frascos.
6. Extraer la membrana asépticamente con una pinza estéril.
7. Cortar la membrana con una tijera estéril en dos mitades.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 001	Página 6 de 11	
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana			Vigente a partir de:	
	Elaboró	Revisó	Autorizó		

DETERMINACION DE BACTERIAS

1. Colocar la mitad de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Tioglicolato.
2. Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
3. Incubar los tubos a 30° - 35 °C por 7 días.
4. Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.
5. Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS

1. Colocar la otra mitad de la membrana en un tubo que contiene 100 mL de medio Caseína de soya digerido.
2. Debe llevarse un tubo control que contiene la misma cantidad de medio que la muestra.
3. Incubar los tubos a 20° - 25 °C por 14 días.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 001	Página 7 de 11	
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana			Vigente a partir de:	
	Elaboró	Revisó	Autorizó		

4. Deben observarse periódicamente los tubos durante el tiempo de incubación para detectar el crecimiento precoz o no de los microorganismos, turbidez, crecimiento en la superficie y otros.
5. Si se observa crecimiento deberá repetirse el ensayo con el doble de muestra.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

1. Para que la muestra a ensayar se considere estéril ninguno de los tubos debe presentar turbidez.
2. Cuando no se observa crecimiento en los tubos de muestra significa que el producto es estéril. El tubo control en todos los casos debe ser negativo.
3. Si en el primer ensayo se observa turbidez en alguno de los tubos, se repite el análisis con el doble de muestra, si aparece nuevamente la turbidez, la muestra se rechaza. Si no se produce turbidez, se anula el primer resultado y la muestra se aprueba.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 001	Página 8 de 11
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó		Autorizó	

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. El equipo de filtración debe estar estéril.
2. Los medios de cultivo a utilizar deben ser recientemente preparados y esterilizados.
3. Las muestras a analizar deben ser abiertas únicamente bajo la campana de flujo laminar.
4. Los tubos incubados deben observarse detenidamente con una lente de aumento.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 40 envases de 1 mL



Verter el
contenido de
los 40 frascos



	Procedimiento Normalizado	Código: MV - 001	Página 9 de 11
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana	Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó	

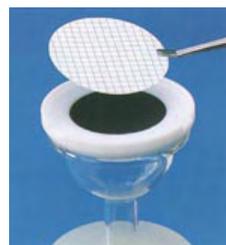
Tomar 10 mL
con pipeta



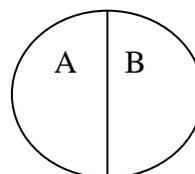
Filtrar



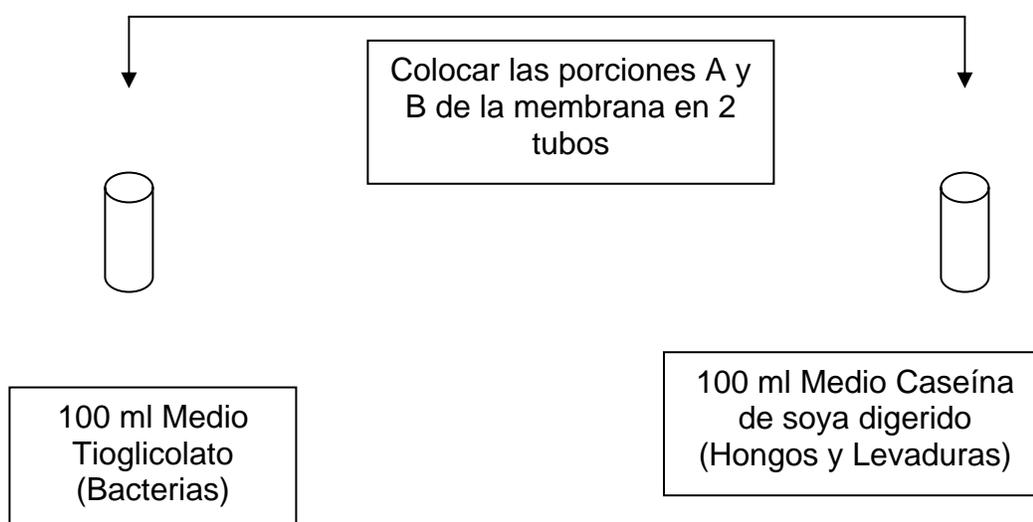
Remover la membrana
en forma aséptica



Cortar en dos mitades



	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 001	Página 10 de 11
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana		Vigente a partir de:	
			Elaboró	



NOTA: en cada caso deberá llevarse un tubo control, el cual contendrá igual volumen de Medio de Cultivo estéril, el cual se incubará en las mismas condiciones que las muestras.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 001	Página 11 de 11
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE ESTERILIDAD Método de Filtración por Membrana		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó		Autorizó



Incubar de 30° - 35° C por 7 días, para determinar Bacterias.

Incubar de 20° - 25° C por 14 días, para determinar Hongos y Levaduras.

Observar los tubos periódicamente. No debe haber turbidez en los medios.

H. BIBLIOGRAFIA

- Control Microbiológico de los Medicamentos, Pérez Alba, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONSYTEC, primera edición, Perú, 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 25, United States Convention, Twinbrook, Parkway, Rockville, USA, año 2002.
- Filtración por Membrana: www.servitel.es/ned/sarto/esp/f23e.htm
- Control de Calidad de Vacunas: www.edicion-micro.usal.es

I. ANEXOS:

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 002	Página 1 de 5	
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE TOXICIDAD Método de Biológico			Vigente a partir de:	
	Elaboró	Revisó	Autorizó		

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para determinar la presencia de sustancias tóxicas en las vacunas.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a toda muestra de vacunas con excepción de las vacuna contra la viruela y la vacuna BCG.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Vacunas: son preparaciones hechas a base de microorganismos muertos o atenuados causantes de enfermedades. Crean anticuerpos contra la enfermedad que el microorganismo produce cuando son administradas al paciente.

Bacterias: microorganismos unicelulares, se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Hongos: son organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

Levaduras: células micóticas sencillas, ovals a redondas que forman yemas para reproducirse.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 002	Página 2 de 5	
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE TOXICIDAD Método Biológico			Vigente a partir de:	
	Elaboró	Revisó	Autorizó		

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
2. Los métodos y procedimientos empleados son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 002	Página 3 de 5
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE TOXICIDAD Método Biológico		Vigente a partir de:	
			Elaboró	Revisó

G. DESARROLLO:

I- INTRODUCCION:

El propósito de esta prueba es determinar la presencia de contaminantes altamente tóxicos, para lo cual se realizan ensayos empleando cobayos y/o ratones con el fin de determinar la respuesta biológica del animal a cualquier contaminante.

II- EQUIPO Y UTENSILIOS:

- a) Jeringas de Tuberculina
- b) Báscula

III. PROCEDIMIENTO

1. Tomar 5 ratones con peso de 17 a 22 gramos y dos Guinea – pigs de 250 a 350 gramos de peso.
2. Inyectar a cada animal una dosis para humanos o 1 mL de la vacuna.
3. Observar los animales por 7 días consecutivos en busca de cualquier signo de enfermedad.

IV. CALCULOS

No aplica.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 002	Página 4 de 5
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE TOXICIDAD Método Biológico		Vigente a partir de:	
Elaboró		Revisó	Autorizó	

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Para que la muestra a ensayar se considere exenta de toxicidad, todos los animales deben vivir y ninguno debe presentar síntomas de enfermedad durante los 7 días en observación.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Los ratones deben ser adultos, sanos con un peso de 17 – 22 gramos.
Los Guinea – pigs deben ser adultos, sanos con un peso de 250 – 350 gramos de peso.
2. Los animales deben ser monitoreados durante 7 días.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 5 ratones
(peso 17 – 22 gramos) y 2
Guinea – pigs (250 – 350 gramos).



	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 002	Página 5 de 5
	VACUNAS PRUEBAS DE APLICACIÓN GENERAL PRUEBA DE TOXICIDAD Método Biológico		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó		

Administrar una dosis humana o 1 mL de la vacuna a cada animal



Observar los animales por 7 días, ninguno debe morir ni presentar síntomas de enfermedad

H. BIBLIOGRAFIA

- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Convention, Twinbrook, Parkway, Rockville, USA, año 2006.
- Control de Calidad de Vacunas: www.edicion-micro.usal.es

I. ANEXOS:

No aplica.

PRUEBAS DE SEGURIDAD

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 003	Página 1 de 6
	VACUNAS PRUEBAS DE SEGURIDAD Método de Biológico		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para evaluar la seguridad de las vacunas.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a muestras de vacunas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Vacunas: son preparaciones hechas a base de microorganismos muertos o atenuados causantes de enfermedades.

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
2. Los métodos y procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, a su vez deberá documentar los resultados.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 003	Página 2 de 6
	VACUNAS PRUEBAS DE SEGURIDAD Método de Biológico			
			Elaboró	Revisó

F. REGISTROS DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de muestra.	Secretaria y personal encargado.
Protocolo del analista.	Analista encargado.
Limpieza y sanitización del área de trabajo.	Auxiliar de laboratorio.
Monitoreo ambiental.	Analista encargado.
Fichas técnicas.	Auxiliar de laboratorio.
Resultados de análisis.	Analista encargado.

G. DESARROLLO:

I- INTRODUCCION:

El propósito de esta prueba es determinar la seguridad de los productos biológicos para lo cual se realizan ensayos empleando cobayos y/o ratones con el fin de determinar la respuesta biológica del animal a la posible toxicidad del producto.

II- EQUIPO Y UTENSILIOS:

- a) Jeringas
- b) Báscula

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 003	Página 3 de 6	
	VACUNAS PRUEBAS DE SEGURIDAD Método de Biológico			Vigente a partir de:	
				Elaboró	Revisó

III. PROCEDIMIENTO

1. Tomar 2 ratones con peso 22 gramos o más y dos cobayos sanos que pesen menos de 400 gramos.
2. Inyectar a los ratones con 0.5 mL y a los cobayos con 5.0 mL de la muestra por vía intraperitoneal.
3. Observar los animales por 7 días consecutivos en busca de cualquier signo de enfermedad, determinar si hay daño en los tejidos internos por medio de autopsia..

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Para que la muestra a ensayar pase la prueba de seguridades necesario que todos los animales sobrevivan el período de prueba y no deben presentar ninguna respuesta que no sea específica del producto o esperable y que pueda indicar una diferencia en la calidad de dicho producto.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 003	Página 4 de 6
	VACUNAS PRUEBAS DE SEGURIDAD Método de Biológico		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

Los animales no deben pesar menos que al inicio de la prueba.

Si el producto no cumple con los requisitos puede repetirse la prueba en las mismas condiciones que la prueba inicial en una o ambas especies en las que no se cumplió. Si los animales no presentan síntomas de enfermedad entonces el producto pasa la prueba. Si el producto no pasa prueba y han sobrevivido más del 50 % del total de los animales, puede repetirse la prueba nuevamente utilizando el doble de animales de una o ambas especies en las que no se cumplió la prueba. Si los animales no presentan síntomas de enfermedad, entonces el producto pasa prueba.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Los ratones deben ser adultos, sanos con un peso no menor a 22 gramos. Los cobayos deben ser adultos, sanos con un peso menor de 400 gramos.
2. Los animales deben se monitoreados durante 7 días.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 003	Página 5 de 6
	VACUNAS PRUEBAS DE SEGURIDAD Método de Biológico		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Seleccionar 2 ratones (peso no menor a 22 gramos) y 2 cobayos (peso menor a 400 gramos).



Administrar 0.5 mL de la vacuna a los ratones y 5 mL a los cobayos, por vía intraperitoneal



Observar los animales por 7 días, ninguno debe morir ni presentar síntomas de enfermedad, evaluar el daño en los tejidos por medio de autopsia.

	Procedimiento Normalizado		Código: MV - 003	Página 6 de 6
	VACUNAS PRUEBAS DE SEGURIDAD Método de Biológico		Vigente a partir de:	
Elaboró			Revisó	Autorizó

H. BIBLIOGRAFIA

- Farmacopea de los Estados Unidos USP 29, United States Convention, Twinbrook, Parkway, Rockville, USA, año 2006.
- Control de Calidad de Vacunas: www.edicion-micro.usal.es

I. ANEXOS:

No aplica.

CAPITULO VI
INTERPRETACION DE RESULTADOS

6.0 INTERPRETACION DE RESULTADOS

En la investigación realizada en los laboratorios fabricantes de inyectables se pudo determinar la forma en la que se realizan los análisis microbiológicos en las muestras tanto en proceso como en su envase final.

Se estableció que los procedimientos se basan en libros oficiales tales como la Farmacopea de los Estados Unidos USP y la Farmacopea Británica entre otras.

Todos los procedimientos que se realizan están fundamentados en las Buenas Prácticas de Laboratorio y cada analista recibe capacitaciones para reforzar sus conocimientos.

Los métodos de análisis más usados para la evaluación de la calidad microbiológica de los inyectables son:

Prueba de Esterilidad: método de filtración por membrana

Prueba de Pirógenos: método de LAL.

Se pudo constatar que ambos laboratorios presentan similitudes en sus operaciones, las cuales se mencionan a continuación:

- El personal que realiza los procedimientos en el área aséptica se limita a un analista.

Esto se hace con la finalidad de disminuir la probabilidad de contaminación dentro de las áreas; ya que se considera al personal como la principal fuente de contaminación.

- Se realizan programas de capacitación periódica para el personal, este incluye evaluaciones.

Los programas sirven tanto para mantener al personal actualizado sobre las nuevas tendencias en análisis, como para reforzar conocimientos y evaluar si hay necesidad de retroalimentación.

- Cuentan con un programa de control médico para los analistas el cual se realiza cada 6 meses.

Es muy importante que los analistas tengan buena salud, debido a esto son sometidos a control médico lo cual incluye exámenes de heces, sangre, orina, pulmón y control de vacunas.

- El personal que ingresa a las áreas limpias debe estar capacitado, ser disciplinado y tener buena salud.

Los conocimientos y la disciplina son características fundamentales en los analistas, ya que dentro de las áreas limpias éstos se encuentran solos y deben tener la capacidad de realizar los procedimientos correctamente sin tener los protocolos.

- Los medios de cultivo empleados deben cumplir pruebas de pH y esterilidad. En cuanto al material de vidrio se verifica su integridad, la esterilidad se determina por medio de cinta testigo.

La buena calidad de los medios de cultivo y cristalería son fundamentales para tener buenos resultados ya que estos pueden alterar las condiciones del análisis y obtenerse resultados erróneos.

- Las áreas limpias deben cumplir con las condiciones de esterilidad, temperatura y humedad relativa establecidas antes de iniciar los procedimientos.

Los programas de monitoreo de las áreas permiten asegurar que las condiciones de éstas son ideales para poder realizar una jornada de trabajo, si alguna de las condiciones falla no se puede iniciar el procedimiento.

- Cuando un producto no pasa la prueba de esterilidad, se repite el análisis con el doble de muestra y de acuerdo a los nuevos resultados obtenidos el lote es aprobado o rechazado.

Cuando se encuentra contaminación en las muestras es necesario hacer una evaluación de los registros de monitoreo del área, controles en medios de cultivo, cristalería y todos aquellos utensilios que han sido empleados, si no se encuentra prueba de contaminación en todos ellos, se repiten los procedimientos de limpieza del área y se muestrea nuevamente, se procede entonces a analizar, si el producto presenta contaminación, se rechaza y destruye el lote. Si por el contrario no ha contaminación, el lote se aprueba.

Como se puede observar los laboratorios coinciden en un 70 % en sus respuestas, esto indica que sus procedimientos de análisis están basados en normas oficiales lo cual los vuelve más confiables y a su vez permite garantizar la calidad de los productos fabricados.

En cuanto a la investigación bibliográfica, realizada en libros oficiales y no oficiales acerca de las normas que debe seguir el personal que trabaja en áreas de análisis microbiológico de inyectables, estas se basan en las Buenas Prácticas de Laboratorio y se enfocan en eliminar los posibles factores de contaminación que puedan alterar los resultados de los análisis.

El personal debe estar capacitado de acuerdo a las actividades específicas que realiza y además éste debe ser ordenado, disciplinado y confiable. Se deben hacer evaluaciones periódicas con el fin de detectar posibles deficiencias y reforzar conocimientos.

Todos los procedimientos de análisis deben ser realizados en áreas especialmente diseñadas para este fin y que cumplan con las condiciones de esterilidad, temperatura y humedad relativa ya establecidas para evitar la proliferación de microorganismos en su interior.

Los procedimientos para el mantenimiento y monitoreo de las áreas limpias son de gran importancia. La revisión de los resultados obtenidos en estos monitoreos permite determinar el nivel microbiano y la aceptabilidad de las condiciones dentro del área para tener un buen nivel de confiabilidad en los resultados de los análisis.

Todo laboratorio destinado al análisis microbiológico de medicamentos estériles debe cumplir con las normas dictaminadas por las Buenas Prácticas de Laboratorio en cada uno de sus aspectos: estructurales, distribución interna, procedimientos de operación validados, normas para el personal, vestuario,

programas de monitoreo, capacitaciones y otros con el fin de asegurar que los resultados obtenidos en cada uno de los análisis son confiables.

Con respecto a manual de procedimientos de análisis microbiológico de inyectables y vacunas, éste ha sido estructurado con base en el formato que presenta la Norma ISO/IEC 17025 para Laboratorios de Prueba y Calibración.

Los métodos de análisis microbiológico para inyectables han sido tomados de la Farmacopea de los Estados Unidos en su 29^o edición, la cual establece los procedimientos a seguir para cada tipo de muestra de acuerdo a su naturaleza y volumen. Incluye también tablas en donde se determina el número de muestras a tomar y el volumen o peso de muestra requerido para el análisis.

En el caso de las pruebas que deben realizarse a las vacunas, éstas han sido tomadas de publicaciones presentadas por organizaciones internacionales y son específicas para cada tipo de vacuna de acuerdo a su naturaleza, en la mayoría de los casos se trata de pruebas de tipo biológico o serológico. La Farmacopea de los Estados Unidos en su edición 29, presenta también algunas pruebas para este tipo de medicamentos.

CAPITULO VII
CONCLUSIONES

7.0 CONCLUSIONES

1. Los laboratorios fabricantes de medicamentos inyectables deben realizar los análisis microbiológicos exigidos por las normas internacionales a cada lote producido para garantizar la inocuidad del producto. Si un laboratorio no cuenta con los medios para realizar los análisis debe recurrir a un laboratorio externo.
2. Todo laboratorio de análisis microbiológico de inyectables debe contar un manual de procedimientos que contenga las técnicas específicas para evaluar los diferentes tipos de muestras.
3. Para la estructuración de un manual de procedimientos microbiológicos normalizados pueden incluirse tanto métodos oficiales como no oficiales adecuados a los medios con los que cuenta el laboratorio para el cual se ha destinado.
4. El personal que labora en las áreas limpias realizando los análisis microbiológicos a los productos estériles debe ser disciplinado, capacitado y estar conciente de la importancia que tiene el obtener datos exactos en la evaluación de éste tipo de medicamentos.

5. El personal debe recibir capacitaciones en forma periódica, ya sean internas o externas con el fin de mantener actualizados sus conocimientos sobre las nuevas tendencias en los análisis.

6. Los programas de capacitación para el personal deben incluir evaluaciones para detectar fallas y reforzar los puntos en los cuales hay deficiencias.

7. Debe contarse con programas de control médico, con el fin de minimizar la probabilidad de contaminación microbiana tanto de las áreas estériles como de las muestras.

8. El Laboratorio de Análisis Microbiológico debe estar diseñado de tal forma que cada una de las secciones que lo conformen reúnan las características adecuadas para las actividades que se realicen y no sean fuente de contaminación para otras secciones.

9. Las áreas limpias deben estar aisladas del resto de laboratorio y su acceso se hará únicamente por medio de esclusas y siguiendo un protocolo de higiene para el personal previamente establecido.

10. El vestuario empleado dentro de las áreas limpias debe ser estéril y de un material que no desprenda partículas y que además retenga las emitidas por el cuerpo del analista.

11. A las áreas estériles deben ingresar únicamente materiales y utensilios previamente esterilizados con el fin de evitar la contaminación inadvertida de las muestras.

12. Deben establecerse programas de monitoreo para las áreas estériles con el fin de determinar si las condiciones son adecuadas para realizar los procedimientos asépticos.

13. Todos los procedimientos analíticos que se realicen deben ser supervisados y documentados apropiadamente en el expediente del producto.

14. La obtención de resultados confiables en los análisis depende de: el adecuado mantenimiento de las áreas estériles, programas de monitoreo ambiental efectivos, empleo de medios de cultivo de buena calidad y que cumplan con los requisitos, personal capacitado y métodos de análisis validados.

CAPITULO VIII
RECOMENDACIONES

8.0 RECOMENDACIONES

1. Que los laboratorios fabricantes de inyectables cuenten con manuales de procedimientos validados, basados en los libros oficiales vigentes para tener mayor confiabilidad en los resultados que se obtengan.
2. Que los procedimientos normalizados de análisis sean efectuados por analistas capacitados siguiendo fielmente el protocolo establecido para garantizar buenos resultados.
3. A los analistas, que estén concientes de su responsabilidad de obtener datos confiables, realizando correctamente los procedimientos y bajo las normas de las Buenas Prácticas de Laboratorio, para prevenir daños en la salud de los pacientes.
4. A los organismos regulatorios en El Salvador, para que se efectúe un control de calidad más estricto a las vacunas que se distribuyen en los centros de salud en el país.
5. A los laboratorios, para que las áreas de análisis microbiológico cumplan con todas las regulaciones dadas por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

6. A los laboratorios de análisis microbiológico, para que los medios de cultivo, reactivos, utensilios y cepas utilizadas sean de la mejor calidad para garantizar buenos resultados.

7. Que este manual sea utilizado por docentes, estudiantes y laboratorios de análisis microbiológico como una guía para el desarrollo de procedimientos y de elaboración de manuales más específicos de acuerdo a sus requerimientos.

BIBLIOGRAFIA

1. C. Batres, 2001, "Medidas de Aseguramiento de la Calidad en La Fabricación de Inyectables en La Industria Farmacéutica Nacional", Trabajo de Graduación, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, p. 80 – 84.
2. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología E.S), 1999, Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración (NSR 03.00.07:00), 1 ed., San Salvador El Salvador, ISO/ IEC 17025.
3. E. Jawuetz y otros, 1992, "Microbiología Médica", 14 ed. México DF, Editorial El Manual Moderno. p. 3, 7, 49, 273.
4. H. Flores y otras, 2005, "Propuesta de un Manual de Procedimientos Normalizados de Análisis Microbiológico de Alimentos para un Laboratorio de Microbiología", Trabajo de Graduación, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, p. 80-101.
5. M. Pelezar y otro, 1982, "Microbiología", 4 edición, México, Editorial McGraw Hill, p. 663 – 661.
6. Oficina de Publicaciones Especiales de las Comunidades Europeas, 1992, "Buenas Prácticas de Manufactura para Productos Medicinales". Luxemburgo, Bélgica, v. 4. p. 21-32

7. S. Pérez , 1989, "Control Microbiológico de los Medicamentos. Seguridad en La Calidad", primera edición, Perú, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONSYTEC), p. 63 -124
8. United States Pharmacopeia Convention, 2006, "The United States Pharmacopeia USP 29", Twinbrook Parkway, Rockville, Estados Unidos. P. 2720 -2733, 3239 -3241.
9. www.cecmed.sld.cu., 2003, Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, "Directrices sobre Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos", República de Cuba.
10. www.cedon.gob., 2003, Áreas Estériles.
11. www.edicion-micro.usal/esWeb/educativo/m_especial/recursos, 2004, Control de Calidad de Vacunas.
12. [www.lisado de amebocitos méxico.pdf](http://www.lisado.deamebocitos.mexico.pdf), 2006, Limulus polyphemus, México.
13. www.normamexicana.pirogenos.pdf, 1990, Norma Mexicana Pirógenos, NMX-BB-006-1990.
14. [www.normamexicana.vacuna.rabia .pdf](http://www.normamexicana.vacuna.rabia.pdf), 1996, Norma Oficial Mexicana NOM-035-ZOO- Requisitos mínimos para las Vacunas, Antígenos y reactivos empleados en al prevención y Control de la Rabia en las Especies Domésticas, México.

15. www.servitel.es/ned/sarto/esp/f23e.htm., 2007, Servitel, Filtración por Membrana, Estados Unidos.
16. www.wikipedia.org/wiki/antibióticos. , 2007, Wikipedia, Antibióticos, Estados Unidos.

GLOSARIO

Aerobio: Se denomina aerobios a los organismos que necesitan del oxígeno diatómico para vivir. (3)

Anaerobio: organismos que pueden sobrevivir en ausencia de oxígeno. (3)

Antibiótico: medicamentos empleados para tratar infecciones bacterianas y su efecto mata o impide el crecimiento de ciertas clases de bacterias. (16)

Anticuerpos: son glucoproteínas (proteínas unidas a azúcares), también llamadas inmunoglobulinas. Su propósito es reconocer cuerpos extraños invasores como las bacterias y virus para mantener al organismo libre de ellos. (16)

Antígenos: es una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido) de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos. (16)

Antitoxina: es una preparación de globulinas antitóxicas capaces de neutralizar específicamente la toxina producida por un determinado microorganismo. (16)

Bacterias: son microorganismos unicelulares. Tienen típicamente algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm) y se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras, y espirales. (3)

Botulismo: es una toxoinfección bacteriana, una enfermedad rara causada por una toxina nerviosa (*toxina botulínica*) que es producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. (16)

Buenas Prácticas de Laboratorio: (BPL) representan un sistema de calidad relativo a los procesos organizativos y condiciones, bajo las cuales se han de planificar, realizar, controlar, registrar, archivar e informar los estudios experimentales, para garantizar la calidad y validez de los datos de ensayo obtenidos. (6)

Enfermedad del Cólera: enfermedad aguda, diarreica, provocada por una infección intestinal por la bacteria *Vibrio cholerae*. (16)

Embrión: es un organismo pluricelular que se encuentra en sus primeras etapas de desarrollo. (16)

Esterilidad: libre de todo organismo vivo. (3)

Endotoxinas: son polisacáridos de alto peso molecular alojados en la porción lipídica de la pared celular de las bacterias Gramnegativas y los hongos, la cual es responsable de la acción biológica desencadenando entre otros los procesos febriles. (12)

Fiebre Tifoidea: enfermedad infectocontagiosa producida por una bacteria denominada *Salmonella typhi*. La enfermedad se caracteriza por la existencia de fiebre, síntomas abdominales, incremento del tamaño del bazo y cefalea intensa. (16)

Filtro HEPA: son dispositivos que se utilizan para atrapar partículas a través de la ionización de las mismas. Se emplean para reducir la contaminación del aire. Es un dispositivo que remueve partículas de un gas que fluye (como el aire) usando la fuerza de una carga electrostática inducida. (7)

Fluido A: fluido compuesto por digerido péptido de tejido animal y agua, a un pH de 7.1. (7)

Fluido D: fluido compuesto por Fluido A más polisorbato y Tween 80, a un pH de 7.1 ± 0.2 . (7)

Hongos: son organismos eucarióticos (con células nucleadas) que realizan una digestión externa de sus alimentos, secretando enzimas, y absorben luego las moléculas disueltas resultantes de la digestión. (3)

Inmunoglobulinas: son proteínas anticuerpo altamente específicas que son producidas en respuesta a antígenos específicos. (11)

Levaduras: cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la *fermentación* de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias. (3)

Medicamento Parenteral: preparaciones destinadas para ser administradas a través de la piel o los tejidos usando gravedad o fuerza. (16)

Medios de Cultivo: Material nutritivo en el que se pueden recuperar, multiplicar y aislar los microorganismos, así como efectuar pruebas de susceptibilidad. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular, pero también pueden presentarse hidratados y preparados. (16)

Meningitis: es la inflamación, generalmente por causa infecciosa, de las envolturas y membranas (meninges) que recubren el cerebro y la médula espinal. (16)

Patógeno: un agente biológico patógeno es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un huésped (humano, animal, vegetal, etc.) sensiblemente predispuesto. (16)

pH: logaritmo negativo equivalente a la concentración de ión hidrógeno. (4)

Pirógenos: son productos del metabolismo microbiano en donde las sustancias más potentes son las endotoxinas. (12)

Polisacárido: son biomoléculas formadas por la unión de muchos monosacáridos. Se encuadran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reserva energética y estructural. (16)

Polvo Liofilizado: medicamento al cual se le ha eliminado el agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas. (16)

Rabia: enfermedad aguda del sistema nervioso central que afecta a mamíferos, incluidos los humanos. Es causada por un virus **Rhabdovirus** que se transmite por la saliva. Este virus ataca al sistema nervioso central, y si no se trata con la máxima urgencia, acaba provocando la muerte del enfermo. (16)

Tétanos: es una enfermedad seria y frecuentemente mortal provocada por una potente neurotoxina, la exotoxina tetanospasmina, que es producida por la bacteria **Clostridium tetani**, bacteria Gram positiva y anaeróbica. Esta

neurotoxina penetra en las fibras nerviosas motoras periféricas hasta llegar al sistema nervioso central. (16)

Tosferina: enfermedad infecciosa, muy contagiosa, que suele afectar a los niños menores de 5 años. La tosferina es causada por una bacteria llamada ***Bordetella pertussis***. (16)

Tuberculosis: enfermedad producida por el bacilo ***Mycobacterium tuberculosis***. Es una enfermedad de los pulmones, sin embargo, desde los pulmones la enfermedad puede diseminarse a través de la sangre a todos los órganos del cuerpo. (16)

Virus: entidad biológica capaz de autorreplicarse utilizando la maquinaria celular. Es un agente potencialmente patógeno que invade células para poder replicar su material genético, produciendo luego muchas copias del virus original. (16)

ANEXOS

ANEXO 1

Formato de Procedimiento de Análisis

	Procedimiento Normalizado	Código: MI - 0000	Página de
	Nombre del Procedimiento de Análisis		
		Vigente a partir de:	
Elaboró	Revisó	Autorizó	

- A. OBJETIVO:** se establece la finalidad del procedimiento.
- B. ALCANCE:** tipo de muestra a la que va dirigido el análisis.
- C. DEFINICIONES Y TERMINOS:** se definen los principales términos y conceptos mencionados en el procedimiento.
- D. POLITICAS:** son las normas que el laboratorio establece para asegurar el buen desarrollo del procedimiento.
- E. RESPONSABILIDAD:** se designan a los responsables de la ejecución del procedimiento.
- F. REGISTROS DE CALIDAD:** se especifica la documentación necesaria para el registro de las muestras a analizar.
- G. DESARROLLO:** comprende: introducción, equipo y medios de cultivo, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación, aseguramiento de la calidad y diagrama de flujo.
- H. BIBLIOGRAFIA**
- I. ANEXOS**

ANEXO 2

**DETERMINACION DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA POR MEDIO DE LA
FORMULA DE STURGEST**

$$K = 1 + 3.332 \text{ Log } n$$

n = número de industrias farmacéuticas fabricantes de inyectables, n = 8.

K = constante de Sturgest.

Se tiene que: $K = 1 + 3.332 \text{ Log } 8$

$$K = 4.01$$

Tamaño de la muestra: $i = \frac{T \text{ mayor} - T \text{ menor}}{K}$

Donde: i = Tamaño de la muestra.

T mayor = número de industrias fabricantes de inyectables

$$T \text{ mayor} = 8$$

$$T \text{ menor} = 0$$

Entonces:

$$i = \frac{8 - 0}{4.01} = 2 \text{ Laboratorios}$$

$$\% = \frac{i}{T \text{ mayor}} \times 100 = (2/8) \times 100 = 25 \%$$

25 % = 2 Laboratorios. (1)

ANEXO 3

ENTREVISTA



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Entrevista dirigida a personal encargado de realizar análisis microbiológicos de medicamentos parenterales en dos Laboratorios fabricantes.

Objetivo: Realizar un diagnóstico para conocer las normas que rigen los análisis microbiológicos que realizan los laboratorios fabricantes de inyectables a nivel nacional.

1. ¿Cuales son las normas que establecen los procedimientos para el análisis microbiológico de los inyectables elaborados?
2. ¿Cuántas personas se encargan de realizar los análisis microbiológicos?
3. ¿Existe un programa de capacitación para el personal?
4. ¿Se tiene un programa de control médico?, ¿cada cuanto tiempo se realiza?
5. ¿Que requisitos debe cumplir el personal para ingresar al área de análisis microbiológicos?
6. ¿Qué tipo de controles se le realizan a los medios de cultivo y material de vidrio?

7. ¿Que condiciones debe reunir el área limpia antes de proceder a realizar los análisis microbiológicos?
8. ¿Qué tipo de pruebas microbiológicas se realizan a los inyectables?
9. ¿Cuáles son los métodos empleados para determinar la esterilidad y la presencia de pirógenos en las muestras?
10. ¿Qué acciones se toman al obtener resultados inconformes en la esterilidad del producto?

ANEXO 4

LABORATORIOS VISITADOS

Los Laboratorios fabricantes de medicamentos inyectables visitados fueron:

- Laboratorios Ancalmo Internacional
- Laboratorios Pharmedic

En el desarrollo de la entrevista se identificaron de la siguiente forma:

- Laboratorios Ancalmo : **A**
- Laboratorios Pharmedic : **P**

ANEXO 5

TABLA No. 1: CANTIDAD DE MUESTRA A USAR POR ANALISIS

CANTIDAD POR ENVASE	CANTIDAD MINIMA A USAR
<i>Líquidos (no antibióticos)</i>	
Menos de 1 mL	El contenido total de cada envase
1 – 40 mL	La mitad del contenido de cada envase, pero no menos de 1 mL.
Más de 40 mL y no más de 100 mL	20 mL
Más de 100 mL	10 % del contenido del envase, pero no menos de 20 mL
<i>Líquidos Antibióticos y otras preparaciones solubles en agua o en miristato de isopropilo.</i>	El contenido total de cada envase para suministrar no menos de 200 mg.
<i>Sólidos</i>	
Menos de 50 mg	El contenido total de cada envase
50 mg o más, pero menos de 300 mg	La mitad del contenido de cada envase, pero no menos de 50 mg
300 mg – 5 g	150 mg
Más de 5 g	500 mg

ANEXO 6

TABLA No. 2: CLASIFICACION DE LA LIMPIEZA DEL AIRE POR EL NÚMERO DE PARTICULAS POR METRO CÚBICO Y PIE CÚBICO.

Nombre de la Clase	Partículas iguales o mayores de 0.5 µm		
	Sistema Estadounidense	m ³	pies ³
M 1	-	10,0	0,283
M 1.5	1	35.3	1,00
M 2	-	100	2,8
M 2.5	10	353	10,0
M 3	-	1,000	28,3
M 3.5	100	3530	100
M 4	-	10,000	283
M 4.5	1000	35,300	1000

(8)

ANEXO 7

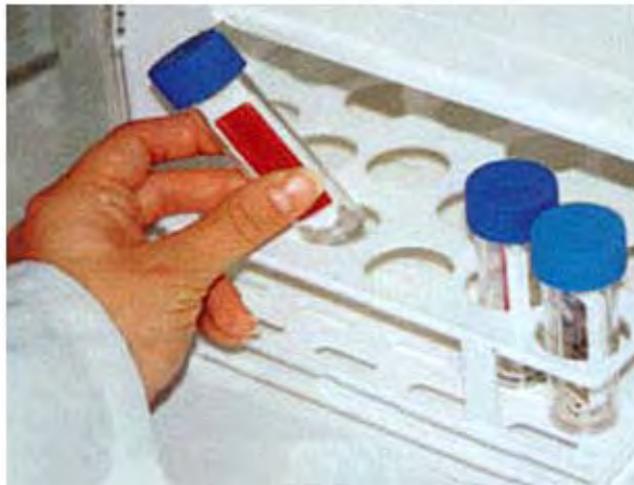


FIGURA No. 1: PLACAS DE LAMINOCULTIVO PARA MUESTREO DE SUPERFICIES. (16)

ANEXO 8

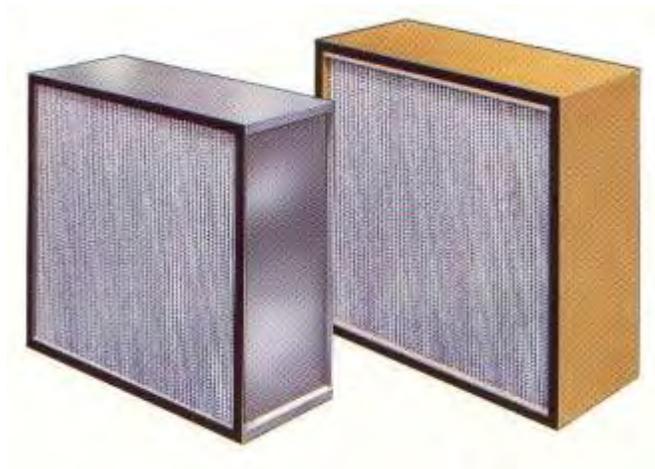


FIGURA No. 2: FILTROS HEPA. (16)

ANEXO 9



FIGURA No. 3: LIMPIEZA Y SANITIZACION DE AREAS. (16)

ANEXO 10

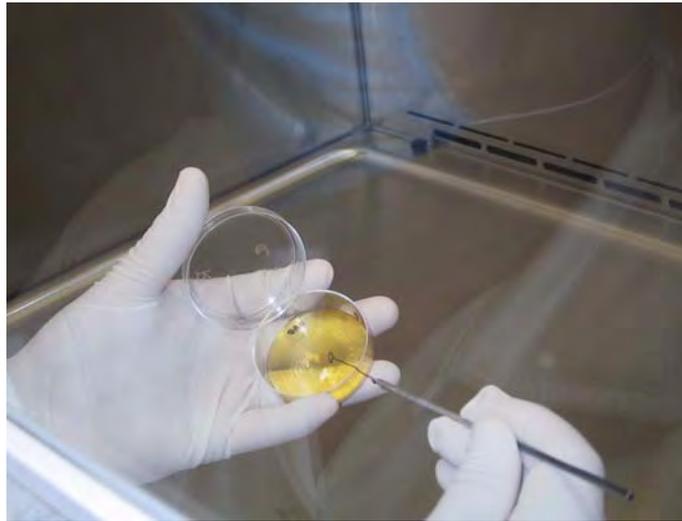


FIGURA No. 4: PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO PARA MEDIOS DE CULTIVO. (15)

ANEXO 11

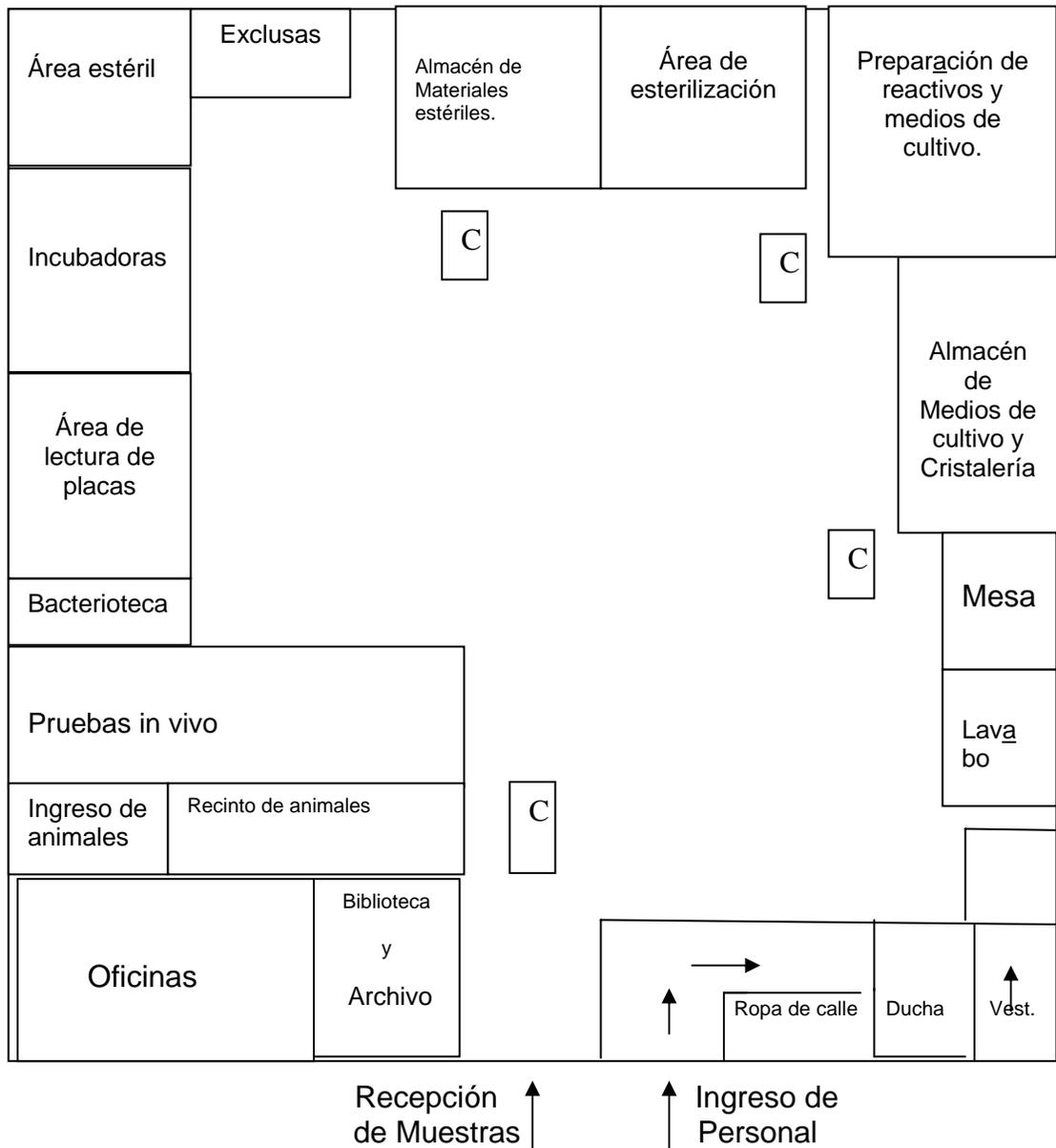


FIGURA No. 5: DIAGRAMA DE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS

MICROBIOLÓGICO. (9)