

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de mayo y hasta el 30 de junio de 2022, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
 Institución o empresa: _____
 Teléfono: _____

Cargo: _____
 Dirección: _____
 Correo electrónico: _____

MONOGRAFÍA NUEVA

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| ESTERILIZACIÓN. INDICADORES BIOLÓGICOS | | |
| CONSIDERACIONES. | | |
| 1 Alcance de indicadores biológicos | | |
| Esta monografía especifica los requisitos generales para la producción, el etiquetado, los métodos de prueba y las características de rendimiento de los indicadores biológicos, incluidos los portadores y suspensiones inoculados, y sus componentes, para ser utilizados en la validación y el monitoreo de rutina de los procesos de esterilización. | | |
| Esta monografía especifica los requisitos básicos y comunes que son aplicables a los indicadores biológicos. Los requisitos para los indicadores biológicos para procesos específicos se proporcionan en otras partes relevantes de ISO 11138. Si no se proporciona una parte posterior específica que se aplica esta monografía. | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>Nota: Pueden aplicarse regulaciones nacionales o regionales.</p> | | |
| <p>Esta monografía no se aplica a los sistemas de pruebas microbiológicas para procesos que dependen de la eliminación física de microorganismos, por ejemplo: Procesos de filtración o procesos que combinan la eliminación física y / o mecánica con la inactivación microbiológica, como el uso de desinfectantes de lavado o el lavado y vaporización de tuberías. Esta monografía, sin embargo, puede contener elementos relevantes para tales sistemas de pruebas microbiológicas.</p> | | |
| <p>2 Referencias normativas</p> | | |
| <p>Los siguientes documentos se mencionan en el texto de tal manera que parte o la totalidad de su contenido constituya los requisitos de esta monografía. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para referencias sin fecha, se aplica la última edición del documento referenciado (incluidas las enmiendas).</p> | | |
| <p>ISO 11135, <i>Sterilization of health-care products — Ethylene oxide — Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices</i></p> | | |
| <p>ISO 11737-1:2006, <i>Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 1: Determination of a population of microorganisms on products</i></p> | | |
| <p>ISO 14937, <i>Sterilization of health care products — General requirements for characterization of a sterilizing</i></p> | | |
| <p><i>agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices</i></p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| ISO 17665-1, <i>Sterilization of health care products — Moist heat — Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices</i> | | |
| ISO 18472, <i>Sterilization of health care products — Biological and chemical indicators — Test equipment</i> | | |
| 4 Requisitos generales de fabricación | | |
| 4.1 Controles de fabricación | | |
| 4.1.1 Sistemas de gestión de calidad | | |
| Se debe establecer, documentar y mantener un sistema de gestión de la calidad de acuerdo con la NOM-241-SSA1-2021 para cubrir todas las operaciones requeridas por esta monografía. En particular, se deben tomar precauciones en todas las etapas de la producción para minimizar la contaminación que afectaría negativamente el desempeño del indicador biológico. | | |
| 4.1.2 Trazabilidad | | |
| 4.1.2.1 Se debe mantener la trazabilidad de los componentes de fabricación. | | |
| 4.1.2.2 Los componentes de fabricación deben incluir todos los materiales incorporados o que entren en contacto directo con la suspensión del organismo de prueba, el vehículo inoculado y / o su paquete primario. | | |
| 4.1.3 Requisitos del producto terminado | | |
| El producto terminado deberá cumplir con los siguientes requisitos: | | |
| a) etiquetado (4.3); | | |
| b) fabricación (Numeral 5); | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| c) características de resistencia (6.4); | | |
| d) almacenamiento y transporte (4.4); | | |
| e) incubación (7.3). | | |
| Nota 1: en ISO 11138-7 se proporciona asesoramiento sobre métodos para el uso de indicadores biológicos. | | |
| Nota 2: pueden existir requisitos nacionales y / o regionales, por ejemplo, en las diversas farmacopeas nacionales o regionales. | | |
| 4.1.4 Personal | | |
| Los procedimientos y métodos en esta monografía deben ser realizados por personal de laboratorio adecuadamente capacitado y con experiencia. | | |
| 4.2 Organismo de prueba | | |
| 4.2.1 Cepa | | |
| 4.2.1.1 Los organismos de prueba deben ser de una cepa definida, disponible a través de una colección de cultivo reconocida, y deben identificarse mediante los métodos de prueba apropiados. Se proporcionará una declaración de trazabilidad al comprador a solicitud. | | |
| 4.2.1.2 El organismo de prueba debe ser una cepa que sea | | |
| a) adecuado para el manejo sin instalaciones especiales de contención, no necesita procedimientos de contención específicos para el manejo y no tiene requisitos específicos de transporte o envío (por ejemplo, Grupo de riesgo 1, OMS 2004), y | | |
| b) suficientemente estable para mantener sus características de resistencia durante la vida útil | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| indicada cuando se transporta y almacena de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. | | |
| Nota: Tradicionalmente, los organismos de prueba de indicadores biológicos han sido esporas bacterianas, generalmente derivadas de especies de <i>Bacillus</i> o <i>Geobacillus</i> . | | |
| 4.2.1.3 Se pueden utilizar organismos de prueba que no sean esporas bacterianas si se ha demostrado que proporcionan una resistencia adecuada al proceso de esterilización. | | |
| 4.2.2 Inóculo de origen para suspensión | | |
| 4.2.2.1 El inóculo inicial para cada lote de suspensión del organismo de prueba debe ser | | |
| a) rastreable a la cultura de referencia y disponible a través de una colección de cultura reconocida, y | | |
| b) verificado en cuanto a su identidad y pureza. | | |
| 4.2.2.2 Los métodos utilizados para mantener los cultivos de organismos de prueba deben diseñarse para protegerlos de la contaminación y para minimizar cualquier cambio inducido en las propiedades inherentes al organismo de prueba. | | |
| 4.2.2.3 Las pruebas de verificación son específicas para cada cepa del organismo de prueba y deben documentarse y validarse. | | |
| 4.2.3 Recuento de organismos de prueba | | |
| El recuento viable de organismos de prueba de la suspensión se determinará de conformidad con el anexo A. | | |
| 4.3 Información que debe proporcionar el fabricante (etiquetado) | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| 4.3.1 La siguiente información se proporcionará en la etiqueta de cada unidad individual de suspensión, envase del portador inoculado e indicador biológico: | | |
| - código único por el cual se puede rastrear el historial de fabricación; | | |
| - el nombre del organismo de prueba; | | |
| - una indicación del proceso de esterilización para el cual la suspensión, los portadores inoculados o los indicadores biológicos son adecuados; | | |
| - la fecha de caducidad, expresada de acuerdo con ISO 8601, p. AAAA-MM-DD; | | |
| - el nombre del fabricante, marca registrada, dirección u otro medio de identificación. | | |
| Se pueden usar símbolos reconocidos internacionalmente cuando sea apropiado (véase 4.1.3, ISO 15223-1 y monografía de <i>Indicadores químicos</i>). | | |
| 4.3.2 Además de la información proporcionada en 4.3.1, la información proporcionada en la <i>Tabla 1</i> se proporcionará en o dentro del empaque secundario de cada lote de producto. | | |

Tabla 1. Información que debe ser proporcionada por el fabricante.

| Información requerida | Suspensión | Portador inoculado | Indicador biológico |
|---|------------|--------------------|---------------------|
| El volumen nominal de suspensión, en ml. | Requerido | --- | --- |
| El proceso para el cual el producto es adecuado para su uso, la resistencia y el procedimiento y el portador utilizados para determinar la resistencia ^a | Requerido | Requerido | Requerido |
| Las condiciones de almacenamiento especificadas | Requerido | Requerido | Requerido |
| Instrucciones de eliminación | Requerido | Requerido | Requerido |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | | | |
|---|---|-----------|-----------|-----------|
| | Instrucciones de uso, especialmente datos sobre el medio, la incubación y otras condiciones que se utilizarán para la recuperación de los organismos de prueba después de la exposición al proceso de esterilización. | Requerido | Requerido | Requerido |
| | El número de organismos de prueba por ml (suspensión) o por unidad (portador inoculado o indicador biológico) ^a | Requerido | Requerido | Requerido |
| | El número de unidades de producto en el paquete secundario | --- | Requerido | Requerido |
| | Una referencia a esta monografía | Requerido | Requerido | Requerido |
| | ^a El fabricante debe suministrar una metodología de prueba utilizada para determinar la resistencia y la población a pedido. | | | |
| 4.3.3 El fabricante deberá especificar el uso de ese instrumento y proporcionar un certificado de calibración e información sobre los procedimientos de recalibración requeridos. | | | | |
| 4.3.4 Si corresponde, se proporcionará información sobre el servicio de mantenimiento requerido del instrumento especificado, incluidas las instrucciones detalladas sobre cómo realizar el mantenimiento, el servicio y su frecuencia. | | | | |
| 4.4 Almacenamiento y transporte | | | | |
| 4.4.1 Las condiciones de almacenamiento y transporte de la suspensión del organismo de prueba se mantendrán de manera que cumpla con los requisitos de esta monografía y, cuando corresponda, una parte posterior de ISO 11138. | | | | |
| 4.4.2 Si los transportadores inoculados se empaquetan para almacenamiento o transporte, se empacarán de manera que no afecten | | | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>negativamente a la población nominal o al rendimiento de transportadores inoculados individuales.</p> | | |
| <p>4.4.3 Las condiciones de almacenamiento y transporte para los transportistas inoculados se mantendrán de manera que los transportadores inoculados cumplan con los requisitos de esta monografía y, cuando corresponda, una parte posterior de ISO 11138.</p> | | |
| <p>4.4.4 Los indicadores biológicos empaquetados individualmente se colocarán en un paquete secundario para su transporte y almacenamiento. El embalaje para el transporte y el almacenamiento garantizará que los indicadores biológicos cumplan con esta monografía y, cuando corresponda, una parte posterior de la ISO 11138.</p> | | |
| <p>5 requisitos de fabricación específicos</p> | | |
| <p>5.1 Suspensiones</p> | | |
| <p>5.1.1 El medio de cultivo y las condiciones de incubación deben producir consistentemente suspensiones de organismos de prueba que cumplan con los requisitos de rendimiento de esta monografía y cualquier parte posterior relevante de ISO 11138.</p> | | |
| <p>5.1.2 El medio de suspensión para la suspensión del organismo de prueba no afectará negativamente la estabilidad del organismo de prueba y será compatible con los procedimientos y materiales empleados en la fabricación de portadores inoculados e indicadores biológicos.</p> | | |
| <p>5.1.3 El método de recolección y el tratamiento posterior de las suspensiones que se utilizarán en la</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>inoculación de los portadores deberán garantizar que los residuos no influyan negativamente en el rendimiento del portador inoculado o del indicador biológico.</p> | | |
| <p>5.2 Transporte, envase primario y secundario</p> | | |
| <p>5.2.1 Los materiales del portador y el envase primario y secundario no deberán contener ninguna contaminación (física, química o microbiana) que pueda afectar negativamente el rendimiento del indicador biológico.</p> | | |
| <p>5.2.2 El transportista, el envase ó empaque primario y paquete secundario, y las condiciones de almacenamiento especificadas se diseñarán de manera que las características de rendimiento del indicador biológico cumplan con los requisitos de esta monografía durante toda la vida útil indicada del producto. El comprador deberá recibir una declaración de los valores máximos y mínimos de cada dimensión del transportista a solicitud.</p> | | |
| <p>5.2.3 Durante y después del proceso de esterilización, el portador y el envase primario no retendrán ni liberarán ninguna sustancia de tal manera que, tras la transferencia al medio de incubación, en condiciones de cultivo, el crecimiento de un bajo número de organismos de prueba sobrevivientes será inhibido Las pruebas deberán cumplir con el Anexo B.</p> | | |
| <p>5.2.4 El transportista, el envase primario y el envase secundario deberán resistir el transporte y la manipulación planificados en el punto de uso, sin daños ni roturas.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>5.2.5 Las materias primas utilizadas para el portador y el envase primario deberán resistir la exposición al proceso de esterilización para el que están destinados de tal manera que se mantengan las características de rendimiento del portador inoculado o indicador biológico. El cumplimiento se probará mediante la observación del portador y el envase primario expuestos a los rangos extremos y las tasas de cambio de las variables químicas y físicas del proceso de esterilización.</p> | | |
| <p>Nota: Las condiciones de esterilización de referencia se pueden encontrar en partes relevantes de ISO 11138.</p> | | |
| <p>5.3 Portador inoculado</p> | | |
| <p>5.3.1 El vehículo inoculado debe estar hecho de materiales que resistan la exposición al proceso de esterilización sin distorsión, fusión, corrosión u otra falla que perjudique el uso del vehículo inoculado.</p> | | |
| <p>5.3.2 Solo se utilizará una cepa del organismo de prueba en un lote de portadores inoculados, a menos que el fabricante haya demostrado que el uso de múltiples cepas no afecta significativamente el rendimiento del organismo de prueba en el proceso de esterilización especificado.</p> | | |
| <p>5.3.3 Antes de la inoculación, el portador deberá esterilizarse de acuerdo con ISO 17665-1, y de la monografía esterilización por óxido de etileno ISO 14937 u otros métodos de esterilización relevantes. Si la esterilización no es factible, se pueden establecer límites aceptables de carga biológica del portador antes de la inoculación de acuerdo con ISO 11737-1, Anexo B.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>5.3.4 Los portadores deben ser inoculados para mantener una población microbiana consistente (véase 6.3).</p> | | |
| <p>5.4 Indicadores biológicos</p> | | |
| <p>5.4.1 Los indicadores biológicos empaquetados individualmente se prepararán colocando los portadores inoculados individuales en un paquete primario.</p> | | |
| <p>5.4.2 El envase primario se validará para su uso previsto (véase Anexo B).</p> | | |
| <p>5.5 Indicadores biológicos autónomos</p> | | |
| <p>Se validará el rendimiento de los indicadores biológicos autónomos, incluida la capacidad del medio de cultivo para promover el crecimiento de los organismos de prueba después de haber sido sometidos al proceso de esterilización.</p> | | |
| <p>6 Determinación de población y resistencia.</p> | | |
| <p>6.1 Requisitos generales de resistencia</p> | | |
| <p>6.1.1 La resistencia de cada lote / lote de indicadores biológicos se evaluará para demostrar la conformidad con los requisitos de rendimiento especificados en esta monografía y cualquier parte posterior relevante de ISO 11138.</p> | | |
| <p>6.1.2 Las características de resistencia de los indicadores biológicos destinados a procesos de esterilización no especificados en cualquier parte posterior de ISO 11138 se definirán utilizando las variables críticas específicas de ese proceso de esterilización (véase ISO 14937).</p> | | |
| <p>6.1.3 Se reconoce que la validación y el monitoreo de algunos procesos de esterilización pueden usar indicadores biológicos que no cumplen con los</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>critérios mínimos de población y / o resistencia especificados en ISO 11138. Estos indicadores biológicos son aceptables siempre que</p> | | |
| <p>a) se cumplen todos los demás requisitos de ISO 11138 (incluido el método de prueba de población y resistencia),</p> | | |
| <p>b) la información del producto incluye una declaración clara de la población y la resistencia, y</p> | | |
| <p>c) la etiqueta del producto lleva una advertencia clara de que la población y / o resistencia (según corresponda) está por debajo del valor especificado en la parte relevante de ISO 11138.</p> | | |
| <p>6.1.4 La prueba de resistencia debe incluir la determinación del recuento viable y la determinación de las características de resistencia (véase 6.3 y 6.4).</p> | | |
| <p>6.2 Organismo de prueba</p> | | |
| <p>Se especificará el organismo de prueba (véase 4.2).</p> | | |
| <p>6.3 Población de organismos de prueba</p> | | |
| <p>6.3.1 Se debe determinar el recuento viable (véase Anexo A).</p> | | |
| <p>6.3.2 La verificación de la población se logrará cuando los resultados caigan dentro del 50 al 300 % de la población nominal declarada por el fabricante. Los resultados de la prueba de confirmación de la población determinada por los usuarios finales o los fabricantes durante la vida útil indicada pueden alcanzar el rango de 50 a 300 %, pero podrían caer por debajo de la especificación de población mínima como se define en esta monografía. En estos casos, la población original se considera verificada si los</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| resultados de la prueba de confirmación están dentro del rango del 50 al 300 %. | | |
| 6.4 Características de resistencia | | |
| 6.4.1 Las características de resistencia se determinarán mediante una combinación de los siguientes métodos: | | |
| a) determinación del valor <i>D</i> a través de la construcción de una curva de supervivencia (véase Anexo C); o | | |
| b) determinación del valor <i>D</i> a través de un método de fracción negativa (véase Anexo D); y | | |
| c) verificación de las características de respuesta de supervivencia / muerte (véase Anexo E). | | |
| 6.4.2 Los valores obtenidos por estos métodos deben estar dentro de los rangos especificados en las partes relevantes de ISO 11138. Al menos dos de estos valores deben incluirse en el etiquetado de los indicadores biológicos (véase 4.3). | | |
| 6.4.3 El valor <i>D</i> debe estar dentro de ± 20 % del valor establecido por el fabricante cuando lo determine el fabricante durante la vida útil indicada utilizando el método especificado por el fabricante. | | |
| Idealmente, la curva de supervivencia es lineal en todo el rango de inactivación. En la práctica, se producen desviaciones de este ideal, pero la linealidad debe mantenerse dentro de límites aceptables. La construcción de una curva de supervivencia por enumeración establece una resistencia para las poblaciones sobrevivientes mayor de aproximadamente 5×10^1 , mientras que el método de fracción negativa establece un cálculo estadísticamente basado en los organismos de | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>prueba sobrevivientes por debajo de ese nivel. Por lo tanto, se puede usar una buena correlación de los valores de <i>D</i> obtenidos por los dos métodos para establecer que no hay desviaciones graves de una curva lineal de supervivencia.</p> | | |
| <p>Las partes relevantes de ISO 11138 pueden requerir determinaciones adicionales [p. valor <i>z</i> para indicadores biológicos para esterilización por calor húmedo (ISO 11138-3) o esterilización por calor seco (ISO 11138-4)].</p> | | |
| <p>Las características de resistencia especificadas en esta monografía y cualquier parte posterior de ISO 11138 se aplican a las condiciones de prueba específicas establecidas en esas partes.</p> | | |
| <p>Los resultados de la prueba de confirmación del valor <i>D</i> determinado por los usuarios finales o los fabricantes durante la vida útil indicada pueden cumplir con el requisito de $\pm 20\%$, pero podrían caer por debajo de la especificación de valor <i>D</i> mínimo como se define en esta monografía. En estos casos, el valor <i>D</i> original se considera verificado si los resultados de la prueba de confirmación están dentro del rango de $\pm 20\%$.</p> | | |
| <p>6.4.4 La curva de supervivencia, cuando se traza como una curva semilogarítmica del \log_{10} del recuento viable de organismos de prueba contra el tiempo, debe ser lineal con un coeficiente de determinación, r^2, de al menos 0.8 (véase Anexo C).</p> | | |
| <p>6.5 Condiciones de prueba</p> | | |
| <p>Las características de resistencia y la población se determinarán utilizando las condiciones de prueba especificadas (véase <i>Tabla 2</i>).</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Tabla 2. Muestras de prueba mínimas según el método

| Método de prueba de la monografía de <i>Indicadores biológicos</i> | Número mínimo de muestras de prueba. | Número mínimo de condiciones de exposición. | Cantidad total mínima de muestras de prueba |
|--|--------------------------------------|---|---|
| Recuento inicial de organismos de prueba viables ^a | 4 | --- | 4 |
| Anexo C método para curva de supervivencia | 4 | 5 | 20 |
| Anexo D método de fracción negativa | 20 | 5 ^b | 100 ^b |
| Anexo E Ventana de letalidad-supervivencia | 50 | 2 | 100 |
| Número total mínimo dependiendo de la elección de la combinación de métodos: | | | 124 a 2014 |
| <p>Nota: las condiciones de prueba comunes para métodos de esterilización específicos se han desarrollado con el tiempo y se presentan en partes relevantes de ISO 11138.</p> <p>a El recuento viable del portador inoculado no procesado o indicador biológico.</p> <p>b El conjunto adicional de condiciones de prueba en la exposición posterior a t_6 (véase <i>Tabla D.1</i>) no se utiliza en los cálculos, pero es una condición para aceptar los resultados de la prueba como válidos.</p> | | | |

7 Condiciones de cultivo

7.1 Incubadora

7.1.1 La incubadora se debe configurar para proporcionar y monitorear para confirmar las condiciones de cultivo especificadas.

7.1.2 Además de la monitorización rutinaria de la temperatura, se debe validar la distribución de temperatura dentro de la incubadora.

7.2 Medio de crecimiento

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>7.2.1 Se debe especificar y demostrar que el medio de crecimiento es compatible con el crecimiento de un inóculo de menos de 100 organismos de prueba.</p> | | |
| <p>7.2.2 El etiquetado debe incluir información sobre las condiciones de cultivo después de la exposición al proceso de esterilización (véase 4.3).</p> | | |
| <p>7.2.3 El medio de crecimiento debe validarse para garantizar que pueda neutralizar cualquier residuo de agente esterilizante que pueda influir en la viabilidad del organismo de prueba (véase 5.2.3).</p> | | |
| <p>7.3 Incubación</p> | | |
| <p>7.3.1 El tiempo de incubación y la temperatura deben ser validados.</p> | | |
| <p>7.3.2 Se proporcionarán instrucciones para la incubación (véase <i>Tabla 1</i>). Se reconoce comúnmente que el tiempo de incubación de referencia es de siete días para los procesos de esterilización establecidos, como el calor húmedo y el óxido de etileno, utilizando organismos de prueba bien caracterizados, como <i>Geobacillus stearothermophilus</i> y <i>Bacillus atrophaeus</i>, respectivamente. Cuando no se disponga de datos suficientes para respaldar un tiempo de incubación de referencia de siete días para un nuevo método de esterilización, se utilizarán al menos 14 días como tiempo de incubación de referencia en el que basar la validación.</p> | | |
| <p>Nota 1: es posible tener un tiempo de incubación validado que sea más corto que el tiempo de incubación de referencia.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>Nota 2: también pueden existir requisitos nacionales o regionales para la validación del tiempo de incubación.</p> | | |
| <p>7.4 Validación de software</p> | | |
| <p>Para las incubadoras que incorporan software o que son software médico en sí mismas, el software se validará de acuerdo con el estado de la técnica teniendo en cuenta los principios del ciclo de vida del desarrollo, la gestión de riesgos, la validación y la verificación.</p> | | |
| <p>7.5 Tiempo de incubación con sistema de detección</p> | | |
| <p>Si se va a utilizar un sistema de detección específico con un indicador biológico específico, el fabricante deberá especificar la combinación de ambos y determinar el tiempo de incubación.</p> | | |
| <p>Anexo A</p> | | |
| <p>(Normativo)</p> | | |
| <p>Determinación de recuento viable</p> | | |
| <p>A.1 General</p> | | |
| <p>A.1.1 Las técnicas de enumeración se utilizan para determinar el número de organismos de prueba viables en suspensión, en portadores inoculados o a partir de indicadores biológicos empaquetados, contando unidades de formación de colonias (UFC) distintas. Este método se utiliza cuando el número esperado de organismos de prueba recuperables es superior a 5×10^1 UFC.</p> | | |
| <p>A.1.2 Los productos relevantes se examinarán para detectar organismos de prueba recuperables de acuerdo con A.2 a A.4. Este método se aplica tanto a las muestras de prueba procesadas como a las no</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>procesadas y puede usarse para la determinación del recuento viable inicial (muestras no procesadas) así como para la determinación del valor <i>D</i> utilizando el método de la curva de sobreviviente (muestras procesadas).</p> | | |
| <p>A.1.3 Se pueden utilizar métodos alternativos de enumeración con equivalencia demostrada a las técnicas de enchapado directo.</p> | | |
| <p>A.2 Número mínimo de muestras de prueba</p> | | |
| <p>Se utilizará un mínimo de cuatro muestras de prueba de cada lote / lote o exposición.</p> | | |
| <p>A.3 Preparación de muestras y métodos de cultivo.</p> | | |
| <p>A.3.1 Las muestras de prueba se colocarán en un volumen apropiado de medio de suspensión. Los organismos de prueba se eluirán de las muestras de prueba mediante un procedimiento validado (por ejemplo, maceración con perlas de vidrio, molienda y / o mezcla en un homogeneizador y / o licuadora, vórtice, ultrasonidos u otro procedimiento apropiado). Ver ISO 11737-1.</p> | | |
| <p>A.3.2 La concentración de microorganismos en las suspensiones se ajustará mediante dilución, si es necesario, en un fluido de dilución estéril apropiado. El número de UFC debe estar dentro de un rango especificado para el método utilizado siempre que sea posible.</p> | | |
| <p>Para cultivos vertidos en agar fundido o esparcidos en agar solidificado en placas de Petri de tamaño regular, se considera que el número de UFC entre 30 y 300 es el más preciso.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>A.3.3 Se utilizará un método apropiado para la enumeración de organismos viables.</p> | | |
| <p>Los métodos apropiados incluyen técnicas de filtración por membrana, difusión directa en medio de crecimiento de agar semisólido o mezcla con medio de crecimiento de agar templado fundido (véase ISO 11737-1).</p> | | |
| <p>A.3.4 El fabricante del indicador biológico debe identificar o poner a disposición un medio adecuado para la recuperación de los organismos de prueba y / o completar los datos e instrucciones para la preparación de dicho medio.</p> | | |
| <p>A.4 Incubación y enumeración</p> | | |
| <p>A.4.1 Las muestras enchapadas o los filtros de membrana se incubarán a las temperaturas y tiempos especificados por el fabricante.</p> | | |
| <p>En general, los tiempos y temperaturas de incubación son de 55 ° C a 60 ° C durante no menos de 48 h para microorganismos termófilos y de 30 ° C a 37 ° C durante no menos de 48 h para microorganismos mesófilos.</p> | | |
| <p>Nota: la desecación del medio de crecimiento puede afectar negativamente el crecimiento a temperaturas de incubación elevadas.</p> | | |
| <p>A.4.2 Después del tiempo de incubación apropiado, se contará el número de unidades formadoras de colonias en las placas o filtros de membrana y se calculará el número medio de organismos de prueba recuperables por unidad apropiada.</p> | | |
| <p>Anexo B</p> | | |
| <p>(Normativo)</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>Determinación de la inhibición del crecimiento por portadores y materiales de envasado primarios expuestos a procesos de esterilización.</p> | | |
| <p>B.1 Principio</p> | | |
| <p>Este método se utiliza para determinar la idoneidad del portador y los materiales de envase primario para el proceso de esterilización previsto mediante la identificación de posibles efectos inhibitorios de estos materiales sobre el crecimiento de los organismos de prueba después de la esterilización. Las propiedades físicas de estos materiales ya deben haber sido probadas para determinar su idoneidad (véase 5.2 y 5.3). Los métodos de prueba se dan en partes relevantes de ISO 11138.</p> | | |
| <p>Las especificaciones para resistómetros se dan en ISO 18472.</p> | | |
| <p>B.2 Materiales</p> | | |
| <p>B.2.1 Una suspensión de organismos de prueba de la misma cepa se preparará de la misma manera que los organismos que se utilizarán para la inoculación de portadores. La suspensión será de población conocida, según lo determinado por el recuento viable, para permitir la dispensación de muestras de prueba con una población de menos de 100 organismos viables.</p> | | |
| <p>B.2.2 La incubadora se debe configurar para proporcionar y monitorear para confirmar la temperatura especificada en las condiciones de cultivo.</p> | | |
| <p>B.2.3 El medio de crecimiento debe ser como se especifica en las condiciones de cultivo.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>B.2.4 Las muestras de prueba deben ser portadores no inoculados o materiales de envase primario preparados de acuerdo con B.3.</p> | | |
| <p>B.3 Procedimiento</p> | | |
| <p>B.3.1 Prepare quince contenedores de medio de crecimiento y equilibre a la temperatura de incubación especificada en las condiciones de cultivo. Utilice el mismo volumen de medio de crecimiento que el utilizado habitualmente para la suspensión, el vehículo inoculado o el indicador biológico.</p> | | |
| <p>B.3.2 Tome una muestra representativa de dieciocho transportadores no inoculados previamente esterilizados y divídalos en nueve grupos de dos. Se envasarán en el material utilizado en la fabricación de los indicadores biológicos.</p> | | |
| <p>Nota: Si la esterilización no es practicable, ver 5.3.3.</p> | | |
| <p>B.3.3 Tome seis grupos de los portadores de la muestra tomada en B.3.2, cada uno con dos portadores, y luego los exponga al proceso de esterilización.</p> | | |
| <p>B.3.4 Configure las condiciones operativas del resistómetro a los valores especificados en las partes relevantes de ISO 11138, según corresponda.</p> | | |
| <p>B.3.5 Al final del proceso, desenvuelva los portadores y transféralos asépticamente al medio de crecimiento sin someterlos a un tratamiento intermedio. Coloque el contenido de un grupo de dos portadores en cada uno de los seis contenedores de medio de crecimiento previamente equilibrados a la temperatura de incubación (véase B.3.1). Registre el tiempo necesario para completar la transferencia.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>B.3.6 Incubar el medio de crecimiento que contiene las muestras de vehículo a la temperatura especificada durante 2 h ± 10 min para permitir que las sustancias inhibidoras se desorben de los vehículos. Retire el medio de crecimiento de la incubadora e inocule cada recipiente con un volumen de la suspensión del organismo de prueba calculado para contener menos de 100 organismos de prueba. Regrese el medio inoculado a la incubadora. Incubar durante el periodo de tiempo validado especificado para la recuperación de indicadores biológicos en condiciones normales de uso.</p> | | |
| <p>B.3.7 El control se realiza transfiriendo los tres grupos restantes de dos portadores, no expuestos al proceso, a los tres contenedores restantes del medio de incubación. Incubar estos recipientes durante 2 h ± 10 min, luego inocular cada recipiente con menos de 100 organismos de prueba e incubarlos durante el tiempo de incubación especificado de la misma manera que se describe en B.3.6.</p> | | |
| <p>B.3.8 La identificación de microorganismos puede realizarse si se sospecha que el uso de vehículos no estériles influye en los resultados de la prueba.</p> | | |
| <p>B.3.9 Para controles de medio de crecimiento, incubar tres recipientes de medio de crecimiento, sin portadores, durante 2 h ± 10 min. Luego inocular cada recipiente con menos de 100 organismos de prueba e incubar durante el tiempo de incubación especificado de la misma manera que se describe en B.3.6.</p> | | |
| <p>B.3.10 Los tres contenedores restantes de medio de crecimiento se utilizan como controles negativos de</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>los medios. Incubar estos contenedores de medios no inoculados durante el período de tiempo validado especificado para la recuperación de indicadores biológicos en condiciones normales de uso.</p> | | |
| <p>B.4 Interpretación de resultados</p> | | |
| <p>B.4.1 Si "no se produce crecimiento" en uno o más de los controles de los medios de crecimiento, el procedimiento de prueba no se considerará válido.</p> | | |
| <p>Nota: "Ningún crecimiento" en los controles de los medios de crecimiento puede ser indicativo de una falla en el control de la población del inóculo del organismo de prueba o de condiciones de recuperación inapropiadas (es decir, medio de crecimiento, tiempo de incubación, temperatura de incubación, etc.).</p> | | |
| <p>B.4.2 Si no se produce "crecimiento" en uno o más de los controles del portador, el portador no se considerará adecuado para la fabricación de portadores inoculados o indicadores biológicos.</p> | | |
| <p>Nota: "No hay crecimiento" en el control del portador donde el crecimiento se produjo en el medio de crecimiento puede indicar que el material del portador es inhibidor del crecimiento del organismo de prueba.</p> | | |
| <p>B.4.3 Si no se produce "crecimiento" en una o más de las seis pruebas de portadores expuestos al proceso de esterilización, el material del portador no se considerará adecuado para la fabricación de portadores inoculados o indicadores biológicos.</p> | | |
| <p>Nota: "Ningún crecimiento" puede ser causado ya sea por altos niveles de absorción de esterilizante o</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| por cambios degradantes en el material portador durante el proceso de esterilización. | | |
| B.4.4 Si se produce "crecimiento" en uno o más de los controles de medios negativos, el procedimiento de prueba no se considerará válido. | | |
| Nota: "Crecimiento" en el control de medios negativos podría indicar que las muestras de medios han sido contaminadas. | | |
| B.5 Determinación de la inhibición del crecimiento por materiales de envasado primarios. | | |
| B.5.1 Las muestras del material de envase primario se analizarán de manera similar al material de soporte (es decir, siga los pasos B.1 a B.4 utilizando los materiales de envase primario como las muestras de prueba). | | |
| B.5.2 La prueba se llevará a cabo utilizando muestras de material de envases primarios equivalentes al doble del área normalmente en contacto con el vehículo inoculado, o para indicadores biológicos autónomos, equivalentes al área normalmente en contacto con el medio de recuperación. Las muestras de ensayo se sumergirán en el medio de crecimiento. | | |
| Anexo C | | |
| (Normativo) | | |
| Determinación del valor <i>D</i> por el método de la curva de supervivencia | | |
| C.1 Principio | | |
| Este método determina el número de organismos de prueba sobrevivientes mediante el conteo directo de unidades formadoras de colonias (UFC). Este | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| método también se conoce como el "método de enumeración directa". Véase también el anexo A. | | |
| Nota: El método tiene un límite inferior práctico de aproximadamente 5×10^1 UFC. | | |
| C.2 Materiales | | |
| C.2.1 Las muestras de prueba que representan suspensiones de esporas, portadores inoculados o indicadores biológicos empaquetados deben incluirse en los materiales. Se requiere un mínimo de 20 muestras de prueba para este método. | | |
| Nota: Los métodos de prueba se dan en partes relevantes de ISO 11138. Las especificaciones para resistómetros se dan en ISO 18472. | | |
| C.2.2 La incubadora se configurará para proporcionar y monitorear para confirmar la temperatura especificada en las condiciones de cultivo. | | |
| C.2.3 El medio de crecimiento especificado en las condiciones de cultivo se incluirá en los materiales. | | |
| C.3 Procedimiento | | |
| C.3.1 Las muestras de prueba se someterán a condiciones de exposición definidas. Se indicará el rango de exposiciones. Véase <i>tabla 2</i> . | | |
| C.3.2 Se utilizará un mínimo de cinco exposiciones que incluirán | | |
| a) una exposición en la que la muestra no se somete al esterilizante (por ejemplo, exposición al tiempo 0), | | |
| Nota: El esterilizante puede estar ausente o reemplazado por un gas o medio inerte. | | |
| b) al menos una exposición en la que la población viable se reduce al 0.01 % del inóculo original (reducción de $4 \log_{10}$), y | | |

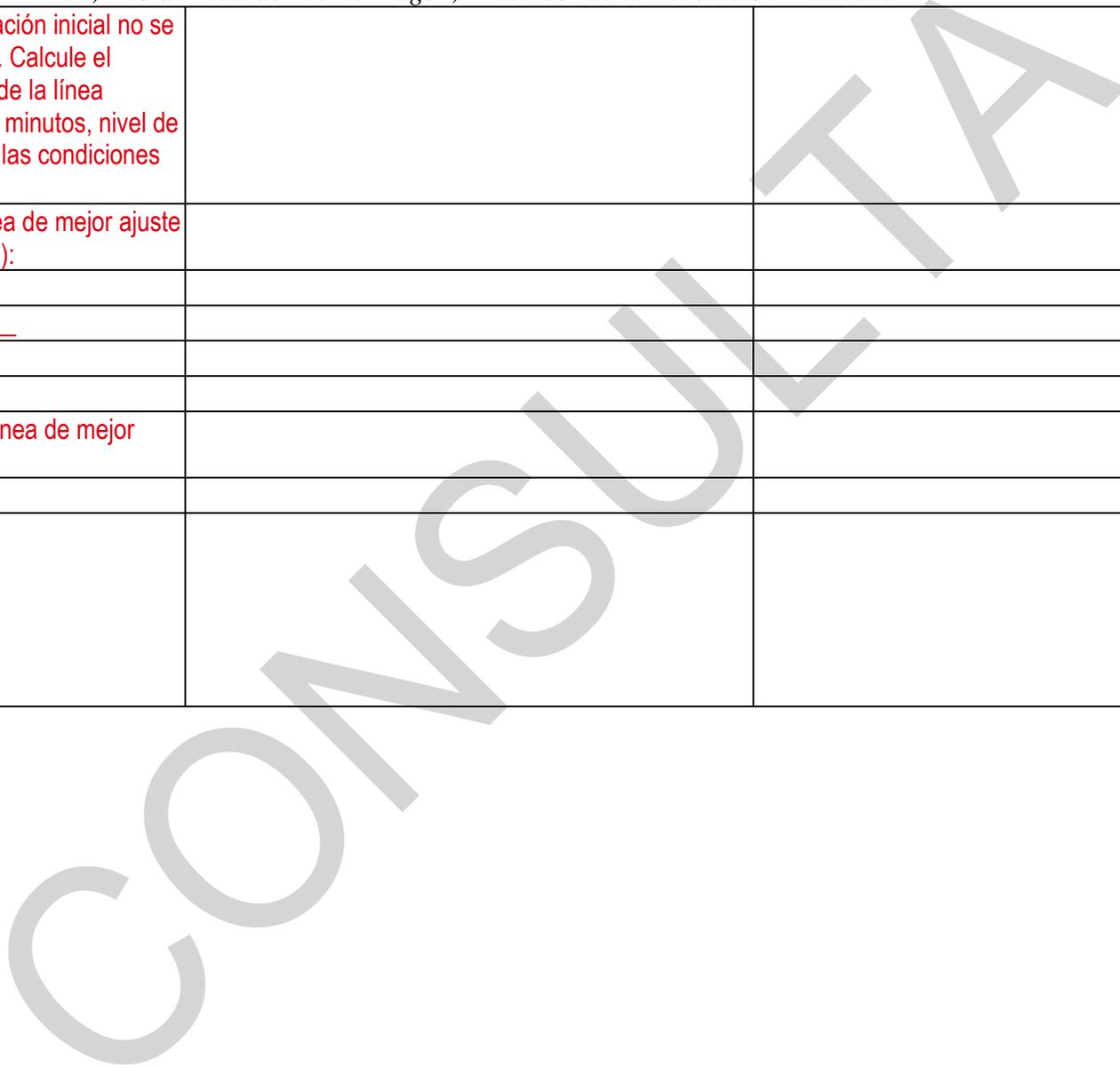
"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>c) un mínimo de tres exposiciones que cubran los intervalos entre la exposición a) y la exposición b) anteriores.</p> | | |
| <p>C.3.3 Se utilizarán no menos de cuatro muestras de prueba para cada exposición en cada determinación. Se utilizará el mismo número de réplicas para cada exposición.</p> | | |
| <p>C.3.4 Si el agente esterilizante deja un residuo en o sobre las muestras de prueba, esto debe neutralizarse lo más rápido posible para no interferir con los resultados de la prueba. Si se requiere un procedimiento de neutralización, será validado.</p> | | |
| <p>C.3.5 Dentro de las 2 h de cada exposición, las muestras de prueba se tratarán para eliminar los organismos de prueba del portador y se realizará un ensayo de recuento viable (véase Anexo A) usando las condiciones de cultivo especificadas y métodos establecidos por el fabricante para la recuperación en condiciones normales de uso.</p> | | |
| <p>C.3.6 Las suspensiones se ajustarán en un fluido de dilución estéril apropiado. Para cultivos vertidos en agar fundido o esparcidos en agar solidificado en placas de Petri de tamaño regular, se considera estadísticamente válido un número de unidades formadoras de colonias entre 30 y 300.</p> | | |
| <p>C.3.7 Utilizando todos los datos obtenidos, trace el \log_{10} de la población sobreviviente en función del tiempo de exposición en minutos, el nivel de dosis u otra variable de proceso y determine la curva rectilínea que mejor se ajuste mediante análisis de regresión utilizando el método de mínimos cuadrados. Los puntos de datos de sobrevivientes</p> | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| dentro de 0.5 logaritmos de la población inicial no se incluirán en el análisis de regresión. Calcule el recíproco negativo de la pendiente de la línea obtenida, que es igual al valor D en minutos, nivel de dosis u otra variable de proceso en las condiciones de exposición establecidas. | | |
| a) La pendiente de la curva rectilínea de mejor ajuste se calcula utilizando la fórmula (C.1): | | |
| $(nG) - (AB)$ | | |
| $m = \frac{\quad}{\quad}$ | | |
| $(nC) - (A^2)$ | | |
| donde: | | |
| m es la pendiente de la curva rectilínea de mejor ajuste; | | |
| n es el número de puntos de datos; | | |
| $G = \sum [t(\log_{10} y)]_i$ $A = \sum (t)_i$ $B = \sum (\log_{10} y)_i$ $C = \sum (t^2)_i$ | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Un ejemplo de análisis de regresión se da en la *tabla C.1*.

Tabla C.1. Ejemplos de análisis de regresión.

| Población recuperada ^a <i>y</i> | Condiciones de Exposición (minutos u otros parámetros críticos) <i>t^b</i> | $\log_{10}y$ | t^2 | $t(\log_{10}y)$ | $(\log_{10}y)^2$ |
|---|---|-------------------------------------|--------------------------------|---|---|
| y_1 | $t_1 = 0.0$ | $\log_{10}y_1$ | $(t_1^2) = 0$ | $t_1(\log_{10}y_1) = 0$ | $(\log_{10}y_1)^2$ |
| y_2 | t_2 | $\log_{10}y_2$ | (t_2^2) | $T_2(\log_{10}y_2)$ | $(\log_{10}y_2)^2$ |
| y_3 | t_3 | $\log_{10}y_3$ | (t_3^2) | $T_3(\log_{10}y_3)$ | $(\log_{10}y_3)^2$ |
| y_4 | t_4 | $\log_{10}y_4$ | (t_4^2) | $T_4(\log_{10}y_4)$ | $(\log_{10}y_4)^2$ |
| y_5 | t_5 | $\log_{10}y_5$ | (t_5^2) | $T_5(\log_{10}y_5)$ | $(\log_{10}y_5)^2$ |
| | $A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$ | $B = \sum_{i=1}^{i=5} \log_{10}y_i$ | $C = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i^2)$ | $G = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i (\log_{10}y_i)]$ | $E = \sum_{i=1}^{i=5} (\log_{10}y_i)^2$ |
| Variable asignada | A | B | C | G | E |

^a según C.3.7, los puntos de datos dentro de 0.5 logaritmos de y_1 no se incluirán en el análisis de regresión.

^b Cualquier parámetro de proceso crítico, p. tiempo (t).

b) Los ejemplos de cálculos para la pendiente de la curva rectilínea de mejor ajuste se encuentran en la *tabla C.2* y siguientes.

Tabla C.2. Ejemplos de cálculos para pendiente.

| Población recuperada ^a <i>y</i> | Condiciones de Exposición (minutos u parámetros críticos) <i>t^b</i> | $\log_{10}y$ | t^2 | $t(\log_{10}y)$ | $(\log_{10}y)^2$ |
|---|---|--------------|-------|-----------------|------------------|
|---|---|--------------|-------|-----------------|------------------|



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | | | | |
|--|------------------------|---------------------------------|----------------------------|---|-------------------------------------|
| $y_1 = 2.5 \times 10^6$ | $t_1 = 0.0$ | $\log_{10}y_1 = 6.397$ 9 | $(t_1^2) = 0$ | $t_1(\log_{10}y_1) = 0$ | $(\log_{10}y_1)^2 = 40.93$ 31 |
| $y_2 = 3.4 \times 10^5$ | $t_2 = 2.0$ | $\log_{10}y_2 = 5.531$ 5 | $(t_2^2) = 4$ | $T_2(\log_{10}y_2) = 11.063$ 0 | $(\log_{10}y_2)^2 = 30.59$ 75 |
| $y_3 = 3.1 \times 10^4$ | $t_3 = 4.0$ | $\log_{10}y_3 = 4.491$ 4 | $(t_3^2) = 16$ | $T_3(\log_{10}y_3) = 17.965$ 6 | $(\log_{10}y_3)^2 = 20.17$ 27 |
| $y_4 = 1.7 \times 10^3$ | $t_4 = 6.0$ | $\log_{10}y_4 = 3.230$ 4 | $(t_4^2) = 36$ | $T_4(\log_{10}y_4) = 19.382$ 4 | $(\log_{10}y_4)^2 = 10.43$ 55 |
| $y_5 = 1.9 \times 10^2$ | $t_5 = 8.0$ | $\log_{10}y_5 = 2.278$ 8 | $(t_5^2) = 64$ | $T_5(\log_{10}y_5) = 18.230$ 4 | $(\log_{10}y_5)^2 = 5.192$ 9 |
| | $A = \sum_{i=1}^5 t_i$ | $B = \sum_{i=1}^5 \log_{10}y_i$ | $C = \sum_{i=1}^5 (t_i^2)$ | $G = \sum_{i=1}^5 [t_i (\log_{10}y_i)]$ | $E = \sum_{i=1}^5 (\log_{10}y_i)^2$ |
| Variable asignada | $A = 20$ | $B = 21.9300$ | $C = 120$ | $G = 66.6414$ | $E = 107.3317$ |
| <p>^a según C.3.7, los puntos de datos dentro de 0.5 logaritmos de y_1 no se incluirán en el análisis de regresión.</p> <p>^b Cualquier parámetro de proceso crítico, p. tiempo (t).</p> | | | | | |
| $m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)}$ $m = \frac{[(5)(66,641.4)] - [(20)(21,930.0)]}{[(5)(120)] - (20^2)}$ $m = \frac{(333,207.0) - (438,600.0)}{(600) - (400)}$ $m = \frac{-105,393.0}{200}$ $m = -0,5270$ | | | | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| c) El valor D es igual al recíproco negativo de la pendiente obtenida y se calcula utilizando la Fórmula (C.2): | | |
| valor $D = -1 (1/m)$ | | |
| Usando la pendiente calculada arriba, el valor D resultante es: | | |
| $D = -1 (1/-0.527 0) = 1.897 5min$ (redondeado a un lugar decimal $D = 1.9min$) | | |
| C.3.8 El valor obtenido para el coeficiente de determinación, r^2 , para la linealidad de la curva de supervivencia no será inferior a 0.8. | | |
| a) El coeficiente de determinación, r^2 , para la linealidad de la curva de supervivencia se calcula utilizando la Fórmula (C.3): | | |
| $r^2 = \frac{\{[(G) - [(A)(B/n)]]\}^2}{[(C) - (A^2/n)][(E) - (B^2/n)]}$ | | |
| Donde todas las variables son definidas como C 3.7 a) y $E = \sum(\log_{10}y)^2$ | | |
| b) Ejemplo de cálculos para el coeficiente de determinación, r^2 , para la linealidad de la curva de supervivencia | | |
| Usando los valores de la <i>tabla C.2</i> : | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| $r^2 = \frac{[(66,6414) - [(20)(21,9300/5)]]^2}{[(120) - (20^2/5)][(107,3317) - (21,9300^2/5)]}$ $r^2 = \frac{[(66,6414) - (87,7200)]^2}{[(120) - (80)][(107,3317) - (96,1850)]}$ $r^2 = \frac{[-21,0786]^2}{[40][11,1467]}$ $r^2 = \frac{444,3074}{445,8680}$ $r^2 = 0,9965$ | | |
| <p>Anexo D</p> | | |
| <p>(Normativo)</p> | | |
| <p>Determinación del valor D por método de fracción negativa</p> | | |
| <p>D.1 Principio</p> | | |
| <p>D.1.1 Este método determina el número de organismos de prueba sobrevivientes mediante un cálculo indirecto basado en el número recuperable de microorganismos según lo determinado por la observación visual del crecimiento en medio de crecimiento fluido. El método denominado "análisis de fracción negativa" es un método en el que una fracción de las muestras de prueba no muestra crecimiento (el rango de fracción negativa) y el cálculo se basa en los resultados obtenidos con estos datos. Un "análisis de muerte total" también es un método de fracción negativa en el que todas las muestras de prueba no muestran crecimiento y el</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>cálculo se basa en los resultados obtenidos con este requisito. Este método se utiliza cuando el número recuperable de organismos de prueba es inferior a 5 UFC / unidad de medida.</p> | | |
| <p>D.1.2 El procedimiento Holcomb-Spearman-Karber (véase D.3.1) y el procedimiento Limited-Holcomb-Spearman-Karber (véase D.3.2) requieren exposiciones sucesivas que abarcan el rango de fracción negativa.</p> | | |
| <p>Nota: Otros métodos pueden ser aplicables, particularmente cuando se conoce la ventana de supervivencia-letalidad. Uno de estos métodos alternativos lo proporciona el procedimiento Stumbo-Murphy-Cochran (véase D.3.3).</p> | | |
| <p>D.1.3 Las muestras de prueba deben someterse a condiciones de exposición definidas que permanezcan dentro de una ventana definida (estado estable), excepto la variable de proceso utilizada para calcular el valor <i>D</i>. Cuando las variables del proceso se consideran aceptablemente estrechas, el tiempo se expresa como "t". Cuando el control de las variables del proceso es demasiado amplio para considerarse constante, se pueden utilizar métodos de integración para calcular el tiempo equivalente "U". Ambos términos se encuentran en la literatura.</p> | | |
| <p>Nota: en los siguientes numerales y fórmulas de este anexo, la variable "t" se puede reemplazar por cualquier otra variable de proceso utilizada para calcular el valor <i>D</i>.</p> | | |
| <p>D.1.4 El número de muestras expuestas, <i>n</i>, en cada exposición y los intervalos entre exposiciones</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| secuenciales, d, ambos afectan la confiabilidad de la prueba. | | |
| D.2 Materiales | | |
| D.2.1 Las muestras de prueba deben ser representativas de suspensiones de esporas, portadores inoculados o indicadores biológicos empaquetados. | | |
| D.2.2 Se utilizará el resistómetro relevante. | | |
| Nota: Los métodos de prueba se dan en partes relevantes de ISO 11138. Las especificaciones para resistómetros se dan en ISO 18472. | | |
| D.2.3 La incubadora se debe configurar para proporcionar y monitorear para confirmar la temperatura especificada en las condiciones de cultivo. | | |
| D.2.4 El medio de crecimiento debe ser como se especifica en las condiciones de cultivo. | | |
| D.3 Procedimiento | | |
| D.3.1 Procedimiento Holcomb-Spearman-Karber (HSKP) | | |
| D.3.1.1 Procedimiento | | |
| D.3.1.1.1 Las muestras de prueba deben someterse a exposiciones graduadas a las condiciones de exposición definidas con todas las variables del proceso, excepto el tiempo, permaneciendo constantes. El número total de muestras de prueba no será inferior a 100. Se utilizará el número mínimo de 20 repeticiones para cada exposición. | | |
| D.3.1.1.2 Se utilizará un mínimo de cinco condiciones de exposición, incluyendo al menos un conjunto de muestras en el que todas las muestras de prueba muestren crecimiento, dos conjuntos de muestras en las que una fracción de las muestras de prueba muestre crecimiento y dos conjuntos de | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>muestras de prueba, a partir de exposiciones secuenciales, en las que no se observa crecimiento.</p> | | |
| <p>Nota: Los detalles de los requisitos para parámetros específicos del proceso del resistómetro se proporcionan en partes relevantes de ISO 11138.</p> | | |
| <p>D.3.1.1.3 Cuando el agente esterilizante deja un residuo en o sobre las muestras de prueba, esto debe neutralizarse lo más rápido posible para no interferir con los resultados de la prueba. Si se requiere un procedimiento de neutralización, será validado.</p> | | |
| <p>D.3.1.1.4 Las muestras se cultivarán después de la exposición de acuerdo con el método especificado por el fabricante.</p> | | |
| <p>D.3.1.1.5 Cada vehículo inoculado se transfiere asépticamente a un tubo de ensayo que contiene un volumen adecuado del medio de crecimiento especificado. El volumen del medio será el mismo para cada réplica. El fabricante de los indicadores biológicos debe identificar o poner a disposición un medio de recuperación adecuado y / o los datos completos para preparar uno (véase también 4.3). Si el fabricante incluye el medio de crecimiento como parte integral del indicador biológico, se deben seguir las instrucciones de cultivo del fabricante.</p> | | |
| <p>D.3.1.1.6 Las muestras de prueba se incubarán siguiendo los métodos especificados por el fabricante.</p> | | |
| <p>Los cultivos se examinarán después del tiempo de incubación recomendado por el fabricante o del período de tiempo de incubación validado (véase 7.3). El crecimiento del organismo de prueba puede</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>indicarse por la turbidez del medio de caldo, el crecimiento en la superficie del caldo o el sedimento en el fondo del tubo, dependiendo de las características del organismo de prueba y el medio de caldo. Si el medio de crecimiento es una parte integral del indicador biológico, p. Los indicadores biológicos autónomos, el crecimiento o no crecimiento del organismo de prueba pueden estar indicados por un cambio de color del pH, y deben interpretarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.</p> | | |
| <p>D.3.1.1.7 Los resultados se registran como la proporción de portadores inoculados con organismos de prueba no recuperables con respecto al número total de portadores inoculados probados en cada exposición subletal.</p> | | |
| <p>D.3.1.2 Cálculos utilizando el HSKP</p> | | |
| <p>D.3.1.2.1 Los cálculos se basan en un mínimo de cinco condiciones de exposición y deben incluir al menos</p> | | |
| <p>un conjunto de muestras en el que todas las muestras analizadas muestran crecimiento,</p> | | |
| <p>dos conjuntos de muestras en las que una fracción de las muestras muestra crecimiento, y</p> | | |
| <p>dos conjuntos de muestras, de exposiciones secuenciales, en las que no se observa crecimiento (véase <i>Tabla D.1</i>).</p> | | |
| <p>Nota: HSKP es similar al procedimiento limitado de Holcomb-Spearman-Karber (véase D.3.2), excepto que utiliza una fórmula genérica que no se limita al mismo número de réplicas en cada condición de</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| exposición o intervalos de tiempo constantes entre exposiciones. | | |
| D.3.1.2.2 El valor D promedio se calcula utilizando la Fórmula (D.1): | | |
| $D = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$ | | |
| Donde: | | |
| $U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i;$ | | |
| N_0 es el conteo viable promedio por indicador determinado por el método de conteo viable total (véase Anexo A); | | |
| U_i es el i -ésimo tiempo de tratamiento; | | |
| k es el primer punto de exposición con todas las unidades negativas. | | |
| Los datos requeridos para el cálculo se dan en la tabla D.1. | | |

Tabla D.1. Ejemplos de datos recopilados para HSKP.

| Tiempo de exposición al agente esterilizante (min) | Número de muestras de prueba expuestas | Número de muestras de prueba que no presentan crecimiento |
|--|--|---|
| t | n | r |
| $t_1(U_1)$ | n_1 | $r_1(r=0)^a$ |
| t_2 | n_2 | r_2 |
| t_3 | n_3 | r_3 |
| t_4 | n_4 | r_4 |
| $t_5(U_{k-1})$ | n_5 | r_5 |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | $t_6(U_k)$ | n_6 | $r_6(r = n_6)$ |
|--|--|-------|------------------|
| | t_7 | n_7 | $r_7(r = n_7)^a$ |
| | <p>Nota: t_1 se define como el tiempo de exposición más largo al agente esterilizante en el conjunto de exposición donde todas las muestras de prueba muestran crecimiento. Los tiempos de exposición t_2 a t_5 aumentan los tiempos de exposición en el área de fracción negativa. Los tiempos de exposición t_6 y t_7 son dos tiempos de exposición secuenciales en los que todas las muestras no muestran crecimiento.</p> <p>^a La prueba es válida si no hay unidades negativas, es decir, no hay muestras de prueba negativas ($r = 0$), con todas las unidades mostrando crecimiento en la exposición anterior a t_1, y todas las muestras de prueba negativas ($r = n_7$), es decir, ninguna mostrando crecimiento en la exposición posterior a t_6.</p> | | |
| D.3.1.2.3 Para los tiempos de exposición al agente esterilizante, t_1 a t_6 , los factores χ y γ se calculan como se muestra a continuación: | | | |
| $\chi_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2}$ $\gamma_i = \frac{r_{i+1}}{n_{i+1}} - \frac{r_i}{n_i}$ | | | |
| Donde: | | | |
| r_i es el número de muestras de prueba que no muestran crecimiento en un tiempo de exposición t_i ; | | | |
| n_i es el número de muestras de prueba expuestas al agente esterilizante en el tiempo de exposición t_i . | | | |
| En t_1 , todas las muestras de prueba muestran crecimiento y así | | | |
| $\gamma_i = \frac{r_{i+1}}{n_{i+1}}$ | | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>A partir de los valores calculados de χ_i y γ_i anteriores, el valor U_i se puede calcular para cada tiempo de exposición, t_i, de la siguiente manera:</p> | | |
| $U_i = \chi_i \gamma_i$ | | |
| <p>D.3.1.2.4 El tiempo medio de esterilidad, UHSK, de cualquiera de las muestras de prueba se puede calcular como la suma de U_i para cada tiempo de exposición t_1 a t_6:</p> | | |
| $U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{i=6} U_i$ | | |
| <p>D.3.1.2.5 Cuando el intervalo entre los tiempos de exposición, d, es constante y se usa el mismo número de muestras de prueba, n, en cada tiempo de exposición, la media de esterilidad, UHSK, se puede calcular utilizando la Fórmula (D.2):</p> | | |
| $U_{\text{HSK}} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{i=6} r_i$ | | |
| <p>Donde:</p> | | |
| <p>U_k = es el primer tiempo de exposición cuando todas las unidades son negativas;</p> | | |
| <p>d = es el intervalo de exposición</p> | | |
| <p>D.3.1.2.6 El valor medio de D, \bar{D}, se puede calcular utilizando la Fórmula (D.3):</p> | | |
| $\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$ | | |
| <p>Nota 1: la constante de Euler = 0.577 2.</p> | | |
| <p>Nota 2: 0.577 2 / \ln_{10} = 0.250 7.</p> | | |
| <p>dónde</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| N_0 es el recuento inicial viable de organismos de prueba por muestra de prueba (véase Anexo A). | | |
| D.3.1.2.7 El intervalo de confianza del 95 % para D ($p = 0.05$), D_{calc} , se calcula utilizando la fórmula (D.4): | | |
| $D_{calc} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$ | | |
| D.3.1.2.8 La varianza, V , se calcula utilizando la fórmula (D.5): | | |
| $V = a \left(\frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2$ | | |
| D.3.1.2.9 La "a" para la varianza se calcula utilizando la fórmula (D.6): | | |
| $a = 0,25 \sum_{i=2}^{i=6} [t_{(i+1)} - t_{(i-1)}]^2 \left[r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_{i-1})} \right]$ | | |
| D.3.1.3 Ejemplo de cálculo del procedimiento Holcomb-Spearman-Karber (HSKP) | | |
| En la <i>tabla D.2</i> se dan ejemplos de cálculo de HSKP. | | |

Tabla D.2. Ejemplos de datos con intervalos de tiempo no constante y número no constante de muestras

| Tiempo de exposición al agente esterilizante min t | Número de muestras de prueba expuestas n | Número de muestras de prueba sin mostrar crecimiento r_i |
|---|---|---|
| $t_1 = 10$ | $n_1 = 20$ | $r_1 = 0$ |
| $t_2 = 18$ | $n_2 = 19$ | $r_2 = 4$ |
| $t_3 = 28$ | $n_3 = 21$ | $r_3 = 8$ |
| $t_4 = 40$ | $n_4 = 20$ | $r_4 = 12$ |
| $t_5 = 50$ | $n_5 = 20$ | $r_5 = 16$ |
| $t_6 = 60$ | $n_6 = 20$ | $r_6 = 20$ |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | $t_7 = 70$ | $n_7 = 20$ | $r_7 = 20$ |
|---|------------|------------|------------|
| D.3.1.3.1 Calcule x_i y y_i (para cada exposición): | | | |
| $x_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2}$ $x_1 = \frac{t_1 + t_{(1+1)}}{2}$ $x_1 = \frac{10 + 18}{2} = 14$ $x_2 = \frac{18 + 28}{2} = 23$ $x_3 = \frac{28 + 40}{2} = 34$ $x_4 = \frac{40 + 50}{2} = 45$ $x_5 = \frac{50 + 60}{2} = 55$ $x_6 = \frac{60 + 70}{2} = 65$ $y_i = \frac{r_{i+1}}{n_{i+1}} - \frac{r_i}{n_i}$ | | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| $\gamma_1 = \frac{r_{1+1}}{n_{1+1}} - \frac{r_1}{n_1}$ $\gamma_1 = \frac{4}{19} - \frac{0}{20} = 0,21$ $\gamma_2 = \frac{8}{21} - \frac{4}{19} = 0,17$ $\gamma_3 = \frac{12}{20} - \frac{8}{21} = 0,22$ $\gamma_4 = \frac{16}{20} - \frac{12}{20} = 0,2$ $\gamma_5 = \frac{20}{20} - \frac{16}{20} = 0,2$ $\gamma_6 = \frac{20}{20} - \frac{20}{20} = 0$ | | |
| <p>Nota: Para los cálculos de γ_4 y γ_5, ambos $\gamma = 0.2$. Esto sucede debido a la cantidad de muestras de prueba que no muestran aumento de crecimiento a una tasa constante en este ejemplo.</p> | | |
| <p>D.3.1.3.2 Calcule U_i para cada tiempo de exposición, t_i:</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| $U_i = X_i \gamma_i$ $U_1 = X_1 \gamma_1 = 14 \times 0,21 = 2,94$ $U_2 = 23 \times 0,17 = 3,91$ $U_3 = 34 \times 0,22 = 7,48$ $U_4 = 45 \times 0,2 = 9,0$ $U_5 = 55 \times 0,2 = 11,0$ $U_6 = 65 \times 0 = 0$ | | |
| <p>D.3.1.3.3 El tiempo medio de esterilidad, UHSK, se calcula utilizando la fórmula (D.7):</p> | | |
| $U_{HSK} = \sum_{i=1}^{i=6} \mu_i$ $U_{HSK} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6$ $U_{HSK} = 2,94 + 3,91 + 7,48 + 9,0 + 11,0 + 0 = 34,33$ | | |
| <p>D.3.1.3.4 El valor medio de D, \bar{D}, se calcula utilizando la fórmula (D.8):</p> | | |
| $\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$ | | |
| <p>dónde</p> | | |
| <p>N_0 es la población inicial de 1×10^5;</p> | | |
| $\bar{D} = \frac{34,33}{5,000 + 0,2507} = 6,54 \text{ min.}$ | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| D.3.1.3.5 El intervalo de confianza del 95 % para D ($p = 05$), D_{calc} , se calcula utilizando la Fórmula (D.9): | | |
| $D_{calc} = \bar{D} \pm 2 \sqrt{V}$ | | |
| D.3.1.3.6 La varianza, V , se calcula utilizando la Fórmula (D.10): | | |
| $V = a \left(\frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5572} \right)^2$ | | |
| D.3.1.3.7 La "a" en la fórmula de varianza para cada t_i y la suma de todos los resultados se calcula utilizando la Fórmula (D.11): | | |

CONSULTA



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| $a = 0,25 \sum_{i=2}^{i=6} \left\{ \left[t_{(i+1)} - t_{(i-1)} \right]^2 \left[r_i \frac{n_i - r_i}{n_i^2 (n_i - 1)} \right] \right\}$ $a = 0,25 \left\{ (t_{1+1} - t_{1-1})^2 \left[r_1 \frac{n_1 - r_1}{n_1^2 (n_1 - 1)} \right] + (t_{2+1} - t_{2-1})^2 \left[r_2 \frac{n_2 - r_2}{n_2^2 (n_2 - 1)} \right] \right.$ $+ (t_{4+1} - t_{4-1})^2 \left[r_4 \frac{n_4 - r_4}{n_4^2 (n_4 - 1)} \right] + (t_{5+1} - t_{5-1})^2 \left[r_5 \frac{n_5 - r_5}{n_5^2 (n_5 - 1)} \right] +$ $a = 0,25 \times [(28 - 10)^2 \times 4 \left(\frac{19 - 4}{361 \times 18} \right) = 2,991 7 +$ $(40 - 18)^2 \times 8 \left(\frac{21 - 8}{441 \times 20} \right) = 5,707 0 +$ $(50 - 28)^2 \times 12 \left(\frac{20 - 12}{400 \times 19} \right) = 6,113 7 +$ $(60 - 40)^2 \times 16 \left(\frac{20 - 16}{400 \times 19} \right) = 3,368 4 +$ $(70 - 50)^2 \times 20 \left(\frac{20 - 20}{400 \times 19} \right) = 0,000 0]$ $a = 0,25 [2,991 7 + 5,707 0 + 6,113 7 + 3,368 4 + 0,000 0]$ | | |
| <p>$a = 0.25 \times 18.180 8 = 4.545 2$</p> | | |
| <p>D.3.1.3.8 La varianza, V, se calcula utilizando la Fórmula (D.12) ahora que se calcula "a":</p> | | |
| $V = a \left(\frac{2,302 6}{\ln N_0 + 0,577 2} \right)^2$ | | |
| <p>Donde:</p> | | |
| <p>$N_0 = 1 \times 10^5;$</p> | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| $V = 4,545 2 \left[\frac{2,302 6}{\ln(1 \times 10^5) + 0,577 2} \right]^2$ $= 4,545 2 \left(\frac{2,302 6}{11,513 + 0,577 2} \right)^2$ $= 4,545 2 \times (0,190 45)^2$ $= 4,545 2 \times 0,036 27;$ $V = 0,164 9.$ | | |
| <p>D.3.1.3.9 El intervalo de confianza del 95 % para D ($p = 0.05$), D_{calc}, se calcula utilizando la fórmula (D.13):</p> | | |
| $D_{calc} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$ | | |
| <p>D.3.1.3.10 Límite de confianza inferior:</p> | | |
| $D_{calc} = \bar{D} - 2\sqrt{V}$ $= 6,54 - 2 \sqrt{0,164 9}$ $= 6,54 - (2 \times 0,4061) = 5,73$ | | |
| <p>D.3.1.3.11 Límite superior de confianza:</p> | | |
| $D_{calc} = \bar{D} + 2\sqrt{V}$ $= 6,54 + 2 \sqrt{0,164 9}$ $= 6,54 + (2 \times 0,406 1) = 7,35$ | | |
| <p>D.3.2 Procedimiento limitado de Holcomb-Spearman-Karber (LHSPK)</p> | | |
| <p>D.3.2.1 Cálculos con LHSPK</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| D.3.2.1.1 Los cálculos para LHSKP se basan en un mínimo de cinco condiciones de exposición y deben incluir al menos | | |
| un conjunto de muestras en el que todas las muestras analizadas muestran crecimiento, | | |
| dos conjuntos de muestras en las que una fracción de las muestras muestra crecimiento, y | | |
| dos conjuntos de muestras en las que no se observa crecimiento (véase <i>Tabla D.3</i>). | | |
| D.3.2.1.2 El procedimiento LHSK es similar al HSKP (véase D.3.1), excepto que utiliza una fórmula que requiere el mismo número de réplicas en cada condición de exposición e intervalos de tiempo constantes entre exposiciones. | | |

Tabla D.3. Ejemplos de datos recopilados para LHSKP con intervalos de tiempo constante y un número constante de muestras.

| Tiempo de exposición al agente esterilizante (min) | Número de muestras de prueba expuestas | Número de muestras de prueba que no presentan crecimiento |
|--|--|---|
| t | n | r |
| $t_1(U_1)$ | n_1 | $r_1(r=0)$ |
| t_2 | n_2 | r_2 |
| t_3 | n_3 | r_3 |
| t_4 | n_4 | r_4 |
| $t_5(U_{k-1})$ | n_5 | r_5 |
| $t_6(U_k)$ | n_6 | $r_6(r=n)$ |
| t_7 | n_7 | $r_7(r=n)^a$ |

^a La prueba es válida si no hay unidades negativas, es decir, no hay réplicas negativas ($r = 0$), en la exposición anterior a U_1 , y todas las réplicas negativas, es decir, todas las réplicas muestran un resultado positivo ($r = n$) en la exposición posterior a U_k .

| | | |
|--|--|--|
| D.3.2.1.3 El tiempo medio de esterilidad, UHSK, se calcula utilizando la fórmula (D.14): | | |
|--|--|--|

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| $U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$ | | |
| <p>dónde</p> | | |
| <p>U_{HSK} es el tiempo medio para la esterilidad;</p> | | |
| <p>U_k es la primera exposición que no muestra crecimiento de las réplicas;</p> | | |
| <p>d es el tiempo o intervalo de dosis entre exposiciones (siendo idéntico);</p> | | |
| <p>n es el número de réplicas en cada exposición (número idéntico en cada exposición, por ejemplo, 20);</p> | | |
| <p>$\sum_{i=1}^{k-1} r_i$ es la suma de los negativos entre U_2 y U_{k-1} inclusive.</p> | | |
| <p>D.3.2.1.4 El valor medio de D, \bar{D}, se puede calcular utilizando la Fórmula (D.15):</p> | | |
| $\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$ | | |
| <p>Nota: Al seguir el método anterior, el procedimiento LHSK permite calcular la varianza, V, la desviación estándar (SD) y el intervalo de confianza del 95 % (los límites de confianza superior e inferior).</p> | | |
| <p>D.3.2.1.5 La varianza, V, se calcula utilizando la Fórmula (D.16):</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| $V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum_{i=1}^{k-1} r_i (n - r_i)$ | | |
| <p>D.3.2.1.6 La desviación estándar (SD) se calcula utilizando la fórmula (D.17):</p> | | |
| $SD = \sqrt{V}$ | | |
| <p>D.3.2.1.7 El intervalo de confianza del 95 % para D ($p = 0.05$), D_{calc}, se calcula utilizando la fórmula (D.18):</p> | | |
| $D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2SD$ | | |
| <p>D.3.2.1.8 D límite de confianza inferior</p> | | |
| $= \frac{U_{\text{HSK}} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$ | | |
| <p>D.3.2.1.9 D límite de confianza superior</p> | | |
| $= \frac{U_{\text{HSK}} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$ | | |
| <p>D.3.2.2 Cálculos de ejemplo del procedimiento limitado Holcomb-Spearman-Karber (LHSPK)</p> | | |
| <p>En la <i>tabla D.4</i> se dan ejemplos de cálculo del LHSPK.</p> | | |
| <p>Tabla D.4. Ejemplos de datos con intervalos de tiempo constante y número constante de muestras</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | Tiempo de exposición al agente esterilizante (min) t | Número de muestras de prueba expuestas n | Número de muestras de prueba que no presentan crecimiento r |
|---|---|---|--|
| | $t_1 = 20(U_1)$ | $n_1 = 20$ | $r_1 = 0 (r=0)$ |
| | $t_2 = 22$ | $n_2 = 20$ | $r_2 = 1$ |
| | $t_3 = 24$ | $n_3 = 20$ | $r_3 = 7$ |
| | $t_4 = 26$ | $n_4 = 20$ | $r_4 = 15$ |
| | $t_5 = 28(U_{k-1})$ | $n_5 = 20$ | $r_5 = 19$ |
| | $t_6 = 30(U_k)$ | $n_6 = 20$ | $r_6 = 20 (r=n)^a$ |
| | $t_7 = 32$ | $n_7 = 20$ | $r_7 = 20 (r=n)$ |
| <p>^a La prueba es válida si no hay unidades negativas, es decir, no hay réplicas negativas ($r = 0$), en la exposición anterior a U_1, y todas las réplicas negativas, es decir, todas las réplicas muestran un resultado positivo ($r = n$) en la exposición posterior a U_k.</p> | | | |
| D.3.2.2.1 El valor D se calcula utilizando la fórmula (D.19): | | | |
| $\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$ | | | |
| Donde | | | |
| $N_0 = 1 \times 10^6$ | | | |
| D.3.2.2.2 El tiempo medio de exposición UHSK requerido para no obtener crecimiento (esterilidad) se calcula usando la Fórmula (D.20): | | | |
| $U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$ | | | |
| Donde | | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| $U_k = 30;$ $d = 2;$ $n = 20;$ $U_{HSK} = 30 - \frac{2}{2} - \frac{2}{20} \times (0 + 0 + 1 + 7 + 15)$ | | |
| $\bar{D} = \frac{24,8}{6,000 + 0,2507} = 3,97 \text{ min}$ | | |
| (redondeado a un decimal $D = 4.0 \text{ min}$). | | |
| D.3.2.2.3 La varianza, V , se calcula utilizando la Fórmula (D.21): | | |
| $V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i) = \frac{2^2}{(20)^2(20-1)} \times [(1 \times 19) + (7 \times 13) + (12 \times 8) + (15 \times 5)]$ | | |
| D.3.2.2.4 La desviación estándar (SD) se calcula utilizando la fórmula (D.22): | | |
| $SD = \sqrt{V}$ $SD = \sqrt{0,1074} = 0,3277$ | | |
| D.3.2.2.5 Los intervalos de confianza del 95 % para D ($p = 0.05$), D_{calc} , se calculan utilizando la Fórmula (D.23): | | |
| $D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2SD$ | | |
| D límite de confianza inferior = | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| $\frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} = \frac{24,8 - (2 \times 0,3227)}{6,000 + 0,2507} = \frac{24,144}{6,2507} = 3,86 \text{ min}$ | | |
| <p>D límite de confianza superior =</p> | | |
| $\frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} = \frac{24,8 + (2 \times 0,3227)}{6,000 + 0,2507} = \frac{25,455}{6,2507} = 4,07$ | | |
| <p>Donde:</p> | | |
| <p>$N_0 = 1 \times 10^6$</p> | | |
| <p>D.3.3 El procedimiento Stumbo-Murphy-Cochran (SMCP)</p> | | |
| <p>D.3.3.1 Procedimiento</p> | | |
| <p>D.3.3.1.1 Se pueden usar otros métodos de análisis de datos de fracción negativa cuando se demuestra la equivalencia con los métodos de D.3.1 y D.3.2.</p> | | |
| <p>D.3.3.1.2 SMCP, un método de número más probable (MPN), puede ser práctico de usar cuando las características de respuesta son predecibles.</p> | | |
| <p>D.3.3.1.3 La fórmula para SMCP requiere un resultado en el rango de fracción negativa que consiste en tiempo, t, el número de unidades negativas para el crecimiento, r, el número de repeticiones, n, en un tiempo de exposición dentro del rango de fracción negativa y el número inicial de microorganismos por réplica, N_0.</p> | | |
| <p>D.3.3.1.4 Para obtener datos válidos utilizando SMCP, el valor D debe calcularse como el promedio</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| de al menos tres corridas en el rango de fracción negativa para confirmar la reproducibilidad. | | |
| D.3.3.1.5 Se aplican los mismos materiales que los de D.2. | | |
| D.3.3.1.6 Para un intervalo de confianza del 95 %, se deben usar no menos de 50 réplicas en cada condición de exposición y se debe cumplir la condición r / n menos de 0.9 para establecer criterios de prueba equivalentes a | | |
| D.3.1 y D.3.2. Las muestras de prueba se someterán a una condición de exposición definida dentro de la ventana de supervivencia / destrucción del lote / lote. | | |
| D.3.3.2 Cálculos utilizando el procedimiento Stumbo-Murphy-Cochran | | |
| D.3.3.2.1 El valor D se calcula utilizando la fórmula (D.24): | | |
| $D = \frac{t}{\log_{10} A - \log_{10} B}$ | | |
| Donde | | |
| t es el tiempo de exposición. | | |
| $\log_{10} A$ es el \log_{10} de la población inicial, N_0 , por réplica; | | |
| $\log_{10} B$ es el \log_{10} de la población después del tiempo de exposición, t . | | |
| D.3.3.2.2 La fórmula (D.24) puede reexpresarse para conjuntos de datos de fracción negativa: | | |
| $D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{n}{r} \right) \right]}$ | | |
| o | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|---|--|
| $D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} N_{\mu_i}}$ | | |
| <p>Donde</p> | | |
| <p>$\log_{10} N_{\mu_i} = \log_{10} (\ln n/r)$ o $\log_{10} [2.303 \log_{10}(n/r)]$</p> | | |
| <p>N_{μ_i} es el logaritmo natural del cociente del número de repeticiones por prueba dividido por el número de muestras negativas;</p> | | |
| <p>n es el número de réplicas por tiempo de exposición;</p> | | |
| <p>r es el número de unidades estériles o que no presentan crecimiento.</p> | | |
| <p>D.3.3.2.3 El intervalo de confianza del 95 % para D ($p = 0.05$), D_{calc}, se calcula utilizando la fórmula (D.25):</p> | | |
| $D_{\text{calc}} = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left(\ln \frac{(1)}{a} \right)}$ | | |
| <p>Donde</p> | | |
| $a = \frac{r}{n} \pm 1,96 \sqrt{\frac{r}{n} \cdot \frac{1-r/n}{n}}$ | | |
| <p>D.3.3.2.4 La fórmula (D.25) solo se puede usar si $n \times r/n \cdot (n-r)/n$ es mayor o igual a 0.9.</p> | | |
| <p>D.3.3.3 Cálculos de ejemplo de SMCP</p> | | |
| <p>Tabla D.5. Cálculos del valor D utilizando solo un conjunto de datos en el rango de fracción negativa</p> | | |
| <p>Tiempo de exposición Min t</p> | <p>Número de muestras expuesto n</p> | <p>Número de muestras que presentan crecimiento r</p> |
| <p>24</p> | <p>100</p> | <p>37</p> |



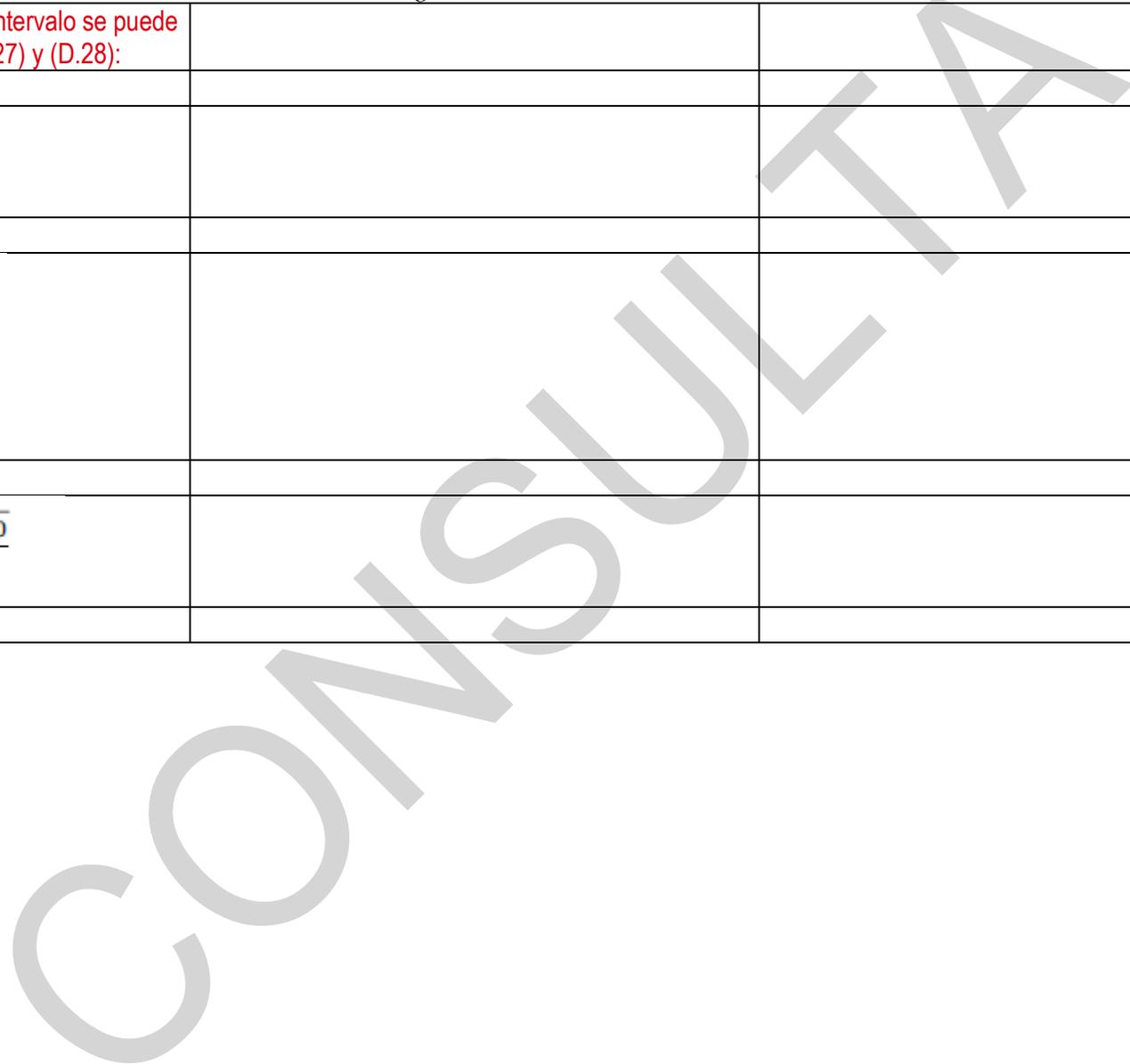
"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| $D = \frac{t}{\log_{10} A - \log_{10} B}$ | | |
| Donde | | |
| t es el tiempo de exposición. | | |
| N_0 es el recuento viable inicial por organismo de prueba por muestra = 1×10^6 ; | | |
| $\log_{10} A$ es el \log_{10} de la población inicial, N_0 , por réplica; | | |
| $\log_{10} B$ es el \log_{10} de la población después del tiempo de exposición, t . | | |
| o | | |
| $\log_{10} N_{ui} = \log_{10}(\ln n/r)$ o $\log_{10} [2.303 \log_{10}(n/r)]$ | | |
| n es el número de réplicas por tiempo de exposición; | | |
| r es el número de unidades estériles o que no presentan crecimiento. | | |
| $D = \frac{24}{6,000 - \log_{10}(\ln 2,702.7)}$ $D = \frac{24}{6,000 - \log_{10}(0,9943)}$ $D = \frac{24}{6,000 - (-0,0025)}$ | | |
| $D = \frac{24}{6,0025} = 4,00 \text{ min}$ | | |
| (redondeado a un decimal $D = 4.0 \text{ min}$) | | |
| D.3.3.3.2 El intervalo de confianza del 95 % para D ($p = 0.05$), D_{calc} , se calcula utilizando la siguiente fórmula si $n \times r/n \cdot (n-r)/n$ es mayor o igual a 0.9, | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| entonces el 95 % de confianza El intervalo se puede calcular utilizando las fórmulas (D.27) y (D.28): | | |
| D límite de confianza inferior = | | |
| $\frac{t}{\log N_0 - \log_{10}(\ln 1 / a)}$ | | |
| Donde | | |
| $a = \frac{r}{n} + 1,96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r}{n}}$ $D_{calc} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}(\ln 1 / a)}$ | | |
| Donde | | |
| $a = \frac{37}{100} + 1,96 \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}}$ | | |
| | | |





"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| $= 0,37 + 1,96 \sqrt{0,37 \times \frac{0,63}{100}}$ $= 0,37 + 1,96 \sqrt{0,37 \times 0,0063}$ $= 0,37 + 1,96 \sqrt{0,002331}$ $= 0,37 + 1,96 \times 0,04828$ $\alpha = 0,465$ $D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10} \left(\ln \frac{1}{0,465} \right)}$ $= \frac{24}{6,000 - \log_{10} (0,7657)}$ $= \frac{24}{6,000 - (-0,1159)}$ $= \frac{24}{6,000 + 0,1159}$ $D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,1159} = 3,92$ | | |
| <p>D límite de confianza superior =</p> | | |
| $\frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} (\ln 1 / \alpha)}$ | | |
| <p>Donde</p> | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| $a = \frac{r}{n} - 1,96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r}{n}}$ $D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}(\ln 1 / a)}$ | | |
| <p>Donde</p> | | |
| $a = \frac{37}{100} - 1,96 \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}}$ $= 0,37 - 1,96 \sqrt{0,37 \times \frac{0,63}{100}}$ $= 0,37 - 1,96 \sqrt{0,37 \times 0,0063}$ $= 0,37 - 1,96 \sqrt{0,002331}$ | | |
| $= 0,37 - 1,96 \times 0,04828$ $a = 0,37 - 0,095 = 0,275$ $D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}\left(\ln \frac{1}{0,275}\right)}$ $= \frac{24}{6,000 - \log_{10}(1,291)}$ $= \frac{24}{6,000 - 0,111}$ $D_{\text{calc}} = \frac{24}{5,889} = 4,08$ | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Anexo E | | |
|--|--|--|
| (Normativo) | | |
| Características de respuesta de supervivencia-letalidad | | |
| E.1 Principio | | |
| El monitoreo de las características de respuesta de supervivencia-letalidad de un lote / lote de indicadores biológicos proporciona un medio adicional para garantizar el rendimiento constante de las unidades dentro de un lote / lote dado. | | |
| Nota: en los siguientes numerales y fórmulas de este anexo, la variable "t" se puede reemplazar por cualquier otra variable de proceso utilizada para calcular el valor <i>D</i> . | | |
| E.2 Materiales | | |
| E.2.1 Las muestras de prueba deben ser representativas de suspensiones de esporas, portadores inoculados o indicadores biológicos empaquetados. | | |
| E.2.2 Se utilizará el resistómetro relevante. | | |
| Nota: Los métodos de prueba se dan en partes relevantes de ISO 11138. Las especificaciones para resistómetros se dan en ISO 18472. | | |
| E.2.3 La incubadora se debe configurar para proporcionar y monitorear para confirmar la temperatura especificada en las condiciones de cultivo. | | |
| E.2.4 El medio de crecimiento debe ser como se especifica en las condiciones de cultivo. | | |
| E.3 Procedimiento | | |
| E.3.1 Se utilizarán no menos de 50 réplicas para confirmar tanto el tiempo de supervivencia como el | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>tiempo de muerte (véase <i>Tabla 2</i>). El valor <i>D</i> calculado mediante el método de la curva de supervivencia (véase el anexo C) o un método de fracción negativa (véase el anexo D) se utilizará para estipular las características de respuesta de supervivencia-letalidad.</p> | | |
| <p>Para lotes con un solo indicador biológico negativo en una prueba de supervivencia, o un solo IB positivo en una prueba de destrucción, se pueden analizar 100 muestras adicionales (mínimo). Si no se obtienen resultados inesperados adicionales, se confirman los tiempos de supervivencia y muerte.</p> | | |
| <p>E.3.2 Las muestras se cultivarán después de la exposición de acuerdo con el método especificado por el fabricante.</p> | | |
| <p>E.3.3 El rendimiento de supervivencia es el tiempo de exposición marcado que da como resultado organismos de prueba sobrevivientes para cada indicador biológico. El rendimiento de eliminación es el tiempo de exposición etiquetado que da como resultado la eliminación de todos los organismos de prueba de cada indicador biológico.</p> | | |
| <p>E.3.4 Las características de rendimiento de supervivencia-letalidad se determinarán en un resistómetro utilizando los parámetros de proceso relevantes del resistómetro.</p> | | |
| <p>Nota: Las condiciones de referencia para procesos de esterilización específicos se proporcionan en partes relevantes de ISO 11138.</p> | | |
| <p>E.3.5 Los valores relevantes para el tiempo de supervivencia y el tiempo de muerte se pueden obtener utilizando las siguientes fórmulas:</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| tiempo de supervivencia = no menos de $(\log_{10}$ población nominal - 2) \times valor D ; tiempo muerto = no más de $(\log_{10}$ población nominal + 4) \times valor D | | |
| E.3.6 El número de unidades ejecutadas por exposición dependerá tanto de la capacidad como de las características de funcionamiento del resistómetro que se esté utilizando. Puede ser necesario realizar varias exposiciones tanto en el momento de supervivencia como en el de muerte para probar el número total de unidades requeridas. | | |
| Anexo f | | |
| (Informativo) | | |
| Relación entre componentes de indicadores biológicos. | | |

Tabla F.1. Relación entre componentes de indicadores biológicos.

| Ilustración Grafica | Componentes | Terminología |
|---|---|------------------------------------|
|  | Microorganismos | Prueba de organismos |
|  | Microorganismos suspendidos en fluido | Suspensión de organismos de prueba |
|  | Microorganismos inoculados en la superficie | Portador inoculado |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|---|
|  | Portador inoculado en el envase primario | Indicador biológico en su empaque individual |
|  | medio de crecimiento con portador inoculado procesado | prueba de las propiedades de crecimiento del portador inoculado procesado |
|  <p>No procesados prueba de las propiedades de crecimiento del portador inoculado</p> | Sistema listo para usar con combinación de portador inoculado y medio de crecimiento | indicador biológico autónomo |
| <p>Nota: Las ilustraciones reflejan las configuraciones físicas comunes de componentes en una presentación gráfica. Las suspensiones de organismos de prueba en fluidos tienen el medio de suspensión como material portador, no un material sólido (véase 3.2).</p> <p>a El fluido empleado puede variar dependiendo de si los microorganismos deben ser retenidos para fines de almacenamiento o empleados para fines de prueba.</p> <p>b Se puede definir como un indicador biológico si se usa para monitorear un proceso de esterilización.</p> <p>c En algunos casos, la superficie puede ser producto para fines de prueba.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| Anexo A | | |
| (Normativo) | | |
| Método para determinar la resistencia a la esterilización con óxido de etileno. | | |
| A.1 Principio | | |
| Este método requiere el uso de un aparato de prueba denominado resistómetro. Las especificaciones de los parámetros del proceso de resistómetro para los procesos de esterilización con óxido de etileno se proporcionan en ISO 18472. | | |
| Los requisitos específicos relacionados con el método de prueba se proporcionan en A.2. | | |
| A.2 Procedimiento | | |
| A.2.1 Cargue las muestras en soportes de muestra adecuados. | | |
| A.2.2 Precaliente la cámara del resistómetro a la condición de prueba de 54 ° C. | | |
| A.2.3 Coloque los soportes de muestra cargados en la cámara, cierre la cámara e inicie el ciclo de prueba. | | |
| A.2.4 Realice la siguiente secuencia de operaciones: | | |
| Paso 1: Evacuar la cámara a un punto de ajuste de vacío de 10 kPa ± 0.5 kPa. | | |
| Paso 2: Admita suficiente vapor de agua para elevar la humedad relativa en la cámara al 60 ± 10 %. | | |
| Mantenga estas condiciones durante un período de 30 ± 1 min. Las muestras deben dejarse calentar a por encima del punto de rocío antes de la inyección de vapor de agua para evitar la posibilidad de condensación. | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|---|--|--|
| <p>Paso 3: Admitir gas de óxido de etileno a la cámara para obtener una concentración de 600 ± 30 mg/L dentro de 60 s. Para el tiempo de exposición de 0 min, no se admitirá gas de óxido de etileno.</p> | | |
| <p>Paso 4: Mantenga estas condiciones durante el tiempo de exposición requerido ± 5 s.</p> | | |
| <p>Paso 5: al final del tiempo de exposición, evacuar la cámara a 10 kPa o menos dentro de 60 s y luego admitir aire filtrado o un gas inerte (como nitrógeno) a presión ambiente.</p> | | |
| <p>Paso 6: repita el paso 5 cuatro veces más o más si es necesario para reducir la exposición del operador a cualquier esterilizante restante en la cámara.</p> | | |
| <p>Paso 7: al final del ciclo de prueba anterior, retire las muestras de la cámara y transfiera las muestras al medio de crecimiento e incubar (véase la monografía de <i>Indicadores biológicos</i>).</p> | | |
| <p>A.2.5 El período de transferencia debe documentarse y se debe usar el mismo período de tiempo para todas las pruebas.</p> | | |
| <p>A.3 Determinación de resistencia</p> | | |
| <p>Las características de resistencia se determinarán de acuerdo con los métodos dados en la monografía de <i>Indicadores biológicos</i>.</p> | | |
| <p>Anexo B</p> | | |
| <p>(Informativo)</p> | | |
| <p>Justificación para la inclusión de una segunda especificación de valor mínimo D como resultado de cambios en el gas de prueba utilizado para evaluar la resistencia y la eliminación del requisito de un valor D mínimo a 30°C</p> | | |
| <p>B.1 Inclusión de un segundo valor mínimo D</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| <p>Esta monografía requiere la prueba del valor <i>D</i> de los indicadores biológicos (IB) de óxido de etileno (OE) en un resistómetro compatible con ISO 18472 utilizando gas de óxido de etileno a una concentración nominal de 600 mg / l. Históricamente, esto fue logrado a menudo por los fabricantes de IB utilizando mezclas de gases de prueba.</p> | | |
| <p>La prueba del valor <i>D</i> de la operación por ciclos completos a 54 ° C realizada por tres fabricantes de indicadores biológicos con sede en los EE. UU. En cuatro productos de indicadores biológicos diferentes demostró que los valores de <i>D</i> obtenidos con 100 % de OE fueron consistentemente más bajos que los valores de <i>D</i> obtenidos en la mezcla de HCFC / OE, a pesar de que la concentración nominal de OE para ambos conjuntos de pruebas fue de 600 mg/L. Las diferencias reportadas entre los valores de <i>D</i> fueron tan altas como 40 %.</p> | | |
| <p>ISO 11138-2: 2006 se ha modificado cambiando el requisito del valor <i>D</i> de 54 °C para agregar una opción de una especificación de valor <i>D</i> de 2.0 min para las pruebas realizadas en 100 % OE, en base a los datos reportados en la publicación revisada por pares. Se prefirió proporcionar una opción para que los fabricantes de IB mantengan el cumplimiento del estándar sin cambiar la resistencia de IB real en lugar de impulsar a los fabricantes para aumentar la resistencia de IB para cumplir con el estándar. Este escenario crearía un mayor riesgo de IB positivos para los usuarios finales cuyos procesos de esterilización fueron validados contra los IB de menor resistencia.</p> | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| | | |
|--|--|--|
| B.2 Supresión del requisito para un valor <i>D</i> a 30°C | | |
| Debido a la falta de datos para respaldar el requisito de un valor <i>D</i> mínimo de 12.5 minutos a 30°C, y la ausencia de evidencia para el uso real de este método de prueba, se ha eliminado de esta monografía. | | |

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

CONSULTA