



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

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 agosto y hasta el 30 de septiembre de 2024, 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: _____

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MGA 0501. INDICADORES BIOLÓGICOS		
Un indicador biológico es una preparación caracterizada de un microorganismo específico resistente a un proceso de esterilización en particular. Los indicadores biológicos se utilizan como auxiliares en la operación de la calificación física de aparatos de esterilización, en el desarrollo y establecimiento de un proceso de esterilización validado para un producto, en la verificación periódica de esterilización validada para un producto, en la verificación periódica de esterilización de equipo, materiales y componentes de empaque que se empleen en procedimientos asépticos y en programas de verificación periódica		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
de ciclos de esterilización previamente establecidos y documentados.		
Los indicadores biológicos pueden presentarse principalmente en dos formas en las cuales se utiliza un cultivo de un microorganismo de una especie conocida. En una de las presentaciones, las esporas se adicionan a un soporte (disco o tira de papel filtro, vidrio o plástico) y se empaca tanto para mantener la integridad del soporte inoculado como para permitir que el agente esterilizante ejerza su efecto sobre el empaque individual. Otra presentación es cuando las esporas se agregan a unidades representativas del lote por esterilizar (producto sin inocular) o a unidades similares; el producto inoculado no afecta negativamente las características de germinación de las esporas viables. Cuando el producto por esterilizar es un líquido, en el cual no es práctico adicionar el indicador biológico a las unidades seleccionadas, las esporas viables pueden agregarse a un producto simulado cuya resistencia al proceso de esterilización no difiere a la presentada por el producto por esterilizar.		
Para utilizar efectivamente un indicador biológico, se precisa tener un conocimiento completo del producto por esterilizar y de sus componentes (materiales y empaque) y tener una idea general del número y tipos de microorganismos que constituyen la carga microbiana presente en el producto inmediatamente antes de la esterilización. Cuando un producto es más sensible a la esterilización se		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
realiza una evaluación más extensa de la carga microbiana. La selección del indicador biológico es crítica y requiere del conocimiento de su resistencia al proceso específico de esterilización de tal manera que cuando es utilizado bajo características de operación representa un desafío al proceso de esterilización que excede al reto de la carga microbiana natural presente en el producto. Las esporas seleccionadas para utilizarse como indicadores biológicos de un proceso en particular, no necesariamente son adecuadas para emplearse en diferentes condiciones del mismo o en otros procesos de esterilización.		
Los indicadores biológicos son una preparación de microorganismos viables de una cepa pura (generalmente esporas de bacterias) inoculados sobre un soporte o portador y que proveen un desafío en la verificación de la efectividad de un proceso de esterilización específico.		
Las características de un indicador biológico se definen utilizando aparatos especiales y perfectamente calibrados, bajo condiciones estrictamente establecidas. Es importante que todos los laboratorios usuarios de un indicador biológico dado tengan acceso a tales aparatos. Las características de resistencia en condiciones de uso de un indicador biológico pueden no ser idénticas a las mencionadas en la etiqueta, si se emplean condiciones y aparatos de esterilización diferentes, el usuario averigua el efecto de tales variaciones y utiliza apropiadamente el indicador biológico para el		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
propósito requerido como en la verificación periódica de ciclos de esterilización o en la validación de un proceso de esterilización, esto es, certificar que la esterilización se llevó a cabo y con una letalidad adecuada. No obstante en la mayoría de los casos, los ciclos de esterilización pueden diseñarse usando como guía lo que indica la etiqueta y evaluando las modificaciones necesarias debidas a las diferencias ya mencionadas en las condiciones de esterilización del fabricante y del usuario. Mantener los aparatos y condiciones de esterilización con especificaciones constantes de un ciclo de esterilización a otro para un uso válido del indicador biológico.		
En los procesos de esterilización por vapor a ciertas temperaturas, se emplean comúnmente esporas de cepas apropiadas de <i>Bacillus stearothermophilus</i> (ATCC 7953), debido a la resistencia que presentan a esta forma de esterilización. En los procesos de esterilización por calor seco u óxido de etileno, se emplean comúnmente esporas de una subespecie de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 9372). Las esporas de cepas de <i>Bacillus pumilus</i> (ATCC 27142), han sido utilizadas como indicadores biológicos para verificación periódica de procesos de esterilización por radiaciones ionizantes.		
El objetivo de estos indicadores es demostrar la correlación que existe entre los parámetros físicos alcanzados en el proceso de esterilización y la destrucción de microorganismos viables, ya que no hay forma de predecir con exactitud la destrucción		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
microbiana basándose en mediciones físicas, excepto en el caso de la esterilización por radiación. Los indicadores biológicos se utilizan en el desarrollo y establecimiento de un proceso de esterilización validado y en la verificación periódica de los procesos de esterilización validados de productos, equipos, materiales y componentes de empaque que se empleen en procedimientos asépticos.		
Usualmente los indicadores biológicos están disponibles comercialmente y contienen una cantidad estandarizada de esporas de un microorganismo específico; sin embargo, hay casos en que no se dispone de indicadores biológicos comerciales apropiados, ya sea por el proceso de esterilización que se desea verificar o la dificultad en la penetración del agente esterilizante, en tales casos se pueden usar suspensiones de esporas estandarizadas y preparadas por el usuario, las cuales se inoculan sobre o dentro del producto a esterilizar de tal forma que se garanticen las condiciones de esterilización deseadas.		
Cuando el producto por esterilizar es un líquido, las esporas viables se debe agregar un producto simulado cuya resistencia al proceso de esterilización sea equivalente a la del producto por esterilizar.		
La preparación de la suspensión concentrada de esporas de los microorganismos seleccionados, requiere del desarrollo de procedimientos apropiados que incluyan cultivos masivos, cosechas		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
y mantenimiento de la suspensión de esporas. La suspensión concentrada contiene predominantes formas inactivas (no germinativas) que se han mantenido en medios líquidos no nutritivos. Es necesario tomar precauciones para asegurar que la preparación del indicador biológico no altera sustancialmente la resistencia al proceso de esterilización de los microorganismos indicadores. El funcionamiento del indicador biológico depende tanto de la cuenta inicial de espora viables, como de su resistencia al proceso de esterilización.		
Es importante, por tanto, que el indicador biológico mantenga su interdependencia entre el número de esporas viables y las características de resistencia a través de su periodo de vigencia. Un indicador biológico preparado a partir de esporas de una cepa microbiana en particular y que se pretende utilizar en una variedad de ciclos empleando el mismo método de esterilización, puede tener diferentes presentaciones: una clase que contenga un número relativamente grande de esporas por inóculo o acarreador, digamos 106 o 107, requiere que el grado de exposición a la esterilización, esto es, el número de valores D aplicados se determinen por la cuantía de la reducción de esporas viables a través de una cuenta real.		
Otros indicadores biológicos contienen solamente el número de esporas requerido para indicar que el ciclo validado ha sido aplicado. El resultado final necesario sería la presencia o ausencia de crecimiento microbiano cuando se cultiva la		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
preparación del indicador biológico. No se realiza una cuenta de esporas particularmente. Otros indicadores biológicos pueden tener cantidades altas o bajas para aplicaciones especiales particulares para verificar periódicamente la esterilización por vapor de instrumental quirúrgico esterilizado en emergencias en el quirófano, cada forma de indicador biológico ha sido validado para cada aplicación. Cuando un indicador biológico es utilizado fuera de las indicaciones de la etiqueta y de las condiciones recomendadas de uso, la verificación mínima de sus parámetros de resistencia sería insuficiente, por lo que habrá de validarse para los propósitos reales de uso para las condiciones en las cuales se va a aplicar.		
Cuando se usan indicadores biológicos disponibles comercialmente, el fabricante debe proporcionar el certificado de calidad que incluya la siguiente información: • Género, especie y número de colección del microorganismo • Número de lote o identificación única • Valor de D (500) y método utilizado para su estimación • Tiempo de muerte y tiempo de sobrevivencia • Proceso de esterilización con la que ha sido caracterizado el indicador biológico		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
- Logaritmo de la cuenta viable de esporas expresada a un decimal y método de recuento - Condiciones de almacenamiento y caducidad - Características del portador, empaque y composición del medio de cultivo para su recuperación cuando aplique - Valor Z Instrucciones de uso, incluido el medio y las condiciones de incubación después de la exposición al proceso de esterilización.		
El usuario debe conservar el certificado de calidad de cada lote de indicador biológico utilizado y usarlo de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Cuando un indicador biológico sea utilizado bajo condiciones diferentes a las indicadas por el fabricante, se debe validar su uso para las condiciones en las cuales se va a aplicar, ya que la confirmación de sus parámetros de resistencia sería insuficiente.		
En caso de que los indicadores biológicos sean preparados por el usuario en forma de suspensión de esporas y sean aplicadas a algún sustrato, el usuario debe realizar las pruebas de: identidad, pureza, cuenta viable y resistencia (valor D). Considerando que los resultados obtenidos son representativos para el medio de suspensión y sustrato utilizado, si se requiere otro tipo de sustrato, se debe determinar nuevamente la cuenta viable y resistencia.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*																					
INDICADORES BIOLÓGICOS EN TIRAS DE PAPEL PARA ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO.																							
Son preparaciones de esporas viables obtenidas a partir de un cultivo derivado de una cepa específica de <i>Bacillus subtilis</i> subespecie <i>niger</i> (ATCC 9372), impregnadas en una tira de papel de calidad satisfactoria, (un papel de calidad adecuada puede ser un papel filtro de velocidad de filtración media, puro y derivado del algodón; cualquier grado de oscurecimiento sin desmenuzamiento no interfiere en su uso) empacadas individualmente en un recipiente adecuado permeable al aire caliente, caracterizado en su resistencia a la esterilización por calor seco y son empleados en programas para calificar, validar y verificar periódicamente los ciclos de esterilización por calor seco.																							
Tabla 0501.1. Tiempos de sobrevivencia y muerte correspondiente a concentraciones específicas de esporas.																							
<table><tr><th>Concentración de esporas (contenido/tiras)</th><th>Tiempo de sobrevivencia (min)</th><th>Tiempo de muerte (min)</th></tr><tr><td></td><td>no menor de</td><td>no mayor de</td></tr><tr><td>10^4 a menos de 5×10^4</td><td>D*</td><td>8D</td></tr><tr><td>5×10^4 a menos de 5×10^5</td><td>2D</td><td>9D</td></tr><tr><td>5×10^5 a menos de 5×10^6</td><td>3D</td><td>10D</td></tr><tr><td>5×10^6 a menos de 5×10^7</td><td>4D</td><td>11D</td></tr><tr><td>5×10^7 a menos de 5×10^8</td><td>5D</td><td>12D</td></tr></table>	Concentración de esporas (contenido/tiras)	Tiempo de sobrevivencia (min)	Tiempo de muerte (min)		no menor de	no mayor de	10^4 a menos de 5×10^4	D*	8D	5×10^4 a menos de 5×10^5	2D	9D	5×10^5 a menos de 5×10^6	3D	10D	5×10^6 a menos de 5×10^7	4D	11D	5×10^7 a menos de 5×10^8	5D	12D		
Concentración de esporas (contenido/tiras)	Tiempo de sobrevivencia (min)	Tiempo de muerte (min)																					
	no menor de	no mayor de																					
10^4 a menos de 5×10^4	D*	8D																					
5×10^4 a menos de 5×10^5	2D	9D																					
5×10^5 a menos de 5×10^6	3D	10D																					
5×10^6 a menos de 5×10^7	4D	11D																					
5×10^7 a menos de 5×10^8	5D	12D																					
Si el indicador biológico empleado para esterilización por calor seco tiene una concentración																							



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
de esporas declarada de 5×10^5 a menos de 5×10^6 esporas por tira, y se sujeta a condiciones de esterilización por calor seco a $160 \pm 5^\circ\text{C}$ tiene un valor D entre 1.3 min y 1.9 min, un tiempo de sobrevivencia no menor de 3.9 min y un tiempo de muerte no mayor a 19 min. Si se tiene otra concentración de esporas declarada y se sujeta a condiciones de esterilización por calor seco a $160 \pm 5^\circ\text{C}$ tiene un valor D entre 1.3 y 1.9 min y tiempos de muerte y de sobrevivencia que correspondan a los especificados en la tabla 0501.1 para varias concentraciones de esporas.		
Si los indicadores son recomendados para temperaturas de esterilización diferentes a $160 \pm 5^\circ\text{C}$ cumplen con las especificaciones anteriores cuando se sujetan a condiciones de esterilización de $160 \pm 5^\circ\text{C}$. Si el indicador biológico es usado bajo otras condiciones de temperatura el valor D puede estar fuera del intervalo especificado en la tabla 0501.1, pero los tiempos de sobrevivencia y muerte relacionados con cada valor D corresponden a los tiempos dados en la tabla 0501.1. El indicador biológico no contiene un número menor de esporas viables que lo indicado en la etiqueta, ni más del 300 % de dicho valor. La población total viable de la tira contiene por lo menos 90 % de esporas.		
CLASIFICACIÓN Y TIPOS O PRESENTACIÓN DE INDICADORES BIOLÓGICOS		
Los indicadores biológicos se clasifican de acuerdo al tiempo de incubación:		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
Primera generación: Lectura por turbidez a los 7 días. Segunda generación: Lectura por cambio de color debido al vire del pH a las 48 horas. Tercera generación: Lectura enzimática de 1 a 4 horas.		
Primera generación: Es una suspensión de esporas que se inoculan en tiras de papel que se aíslan en un sobre de papel cristal que permita la penetración del esterilizante y protege a la tira de la contaminación exterior. Se incuban a la temperatura óptima recomendada durante 7 días. La señal para determinar si un resultado es positivo es la presencia de turbidez, por ejemplo:		
Suspensiones de esporas: Es una población definida de esporas, preparadas a partir de una cepa claramente caracterizada, envasada en viales de vidrio, con una concentración de 10^8 UFC / mL. Esta suspensión es apropiada para la inoculación directa al producto u otro portador, cuando se trata de un portador sólido, se requiere que se deje secar el inóculo.		
Tiras de esporas: Estos indicadores tienen como portador tiras de papel, inoculadas con esporas, empacada de forma individual en sobres de tyvek o papel glassine que son permeables al agente esterilizante; con una concentración de 10^5 o 10^6 UFC/tira.		
Segunda generación: Se le conoce como indicadores biológicos autónomos o de autocontenido, la presentación de estos puede ser		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
en vial o ampollita, se caracteriza por un cambio de color en el medio de cultivo como indicador de pH, en lugar de la turbidez. El tiempo de incubación es de 48 horas a la temperatura recomendada, por ejemplo:		
Ampollitas: Es un sistema de autocontenido donde las esporas están suspendidas en medio de cultivo, que permite dar un resultado de crecimiento, en 48 horas, con un vire de color (de morado a amarillo). Las ampollitas contienen una suspensión de esporas, con una concentración de 10^5 o 10^6 .		
Viales: Este sistema contiene una tira inoculada con esporas asociadas a un medio de cultivo en la ampollita y un indicador de color que destaca un posible crecimiento. El sistema se activa rompiendo la ampollita del medio de cultivo, para que entre en contacto con la tira, el tiempo de incubación está entre 24 y 48 horas a la temperatura recomendada.		
Tercera generación: La espora se activa por reacciones bioquímicas, donde la enzima actúa como catalizador que provocan una reacción en menor tiempo. Estos catalizadores cambian una molécula no fluorescente a una molécula fluorescente cuando la enzima actúa sobre el indicador. La fluorescencia "brilla" o emite una luz a una cierta longitud de onda, por lo que, se utiliza un lector que busca la señal fluorescente. Este indicador proporciona una lectura después 1 a 4 horas de reacción, por ejemplo:		
Los indicadores de esta generación están disponibles en la presentación de vial. Estos		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
indicadores tienen una tira impregnada con esporas y una ampollita conteniendo medio de cultivo sensible al cambio de fluorescencia y de pH, el sistema se activa rompiendo la ampollita del medio de cultivo, para que entre en contacto con la tira, el tiempo de reacción es entre 1 a 4 horas. El cambio de fluorescencia del medio de cultivo se detecta con un Auto-Lector.		
Los indicadores biológicos se encuentran disponibles comercialmente, los cuales contienen una población estandarizada de esporas de la bacteria correspondiente al ciclo de esterilización.		
EMPAQUE Y CONSERVACIÓN:		
Conservar en el empaque original bajo las condiciones recomendadas en la etiqueta; proteger de la luz, sustancias tóxicas, humedad y calor excesivo.		
FECHA DE CADUCIDAD:		
Se determina en base a los estudios de estabilidad y no es menor de 24 meses a partir de la fecha de fabricación la cual se inicia cuando fue realizada la primera cuenta viable total.		
ETIQUETADO:		
En la etiqueta establece que es un indicador biológico en tiras de papel para esterilización por calor seco, indicar su valor D, tiempos de sobrevivencia y de muerte realizados bajo las condiciones de esterilización indicadas		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
en la etiqueta, su cuenta viable de esporas, el origen y la cepa de la cual las esporas utilizadas fueron obtenidas y sus condiciones recomendadas de conservación. La etiqueta indica además, las dimensiones de las tiras de papel e incluir instrucciones para la recuperación de las esporas y su destrucción segura. También se indica que el valor D establecido es reproducible solamente bajo las condiciones exactas de su determinación, que el usuario no necesariamente obtendrá los mismos resultados y puede determinarlo para su uso particular adecuado.		
SELECCIÓN DE INDICADORES BIOLÓGICOS		
Para seleccionar el indicador biológico, se precisa un conocimiento completo del producto por esterilizar y de sus componentes (materiales y empaque), considerar la naturaleza del agente esterilizante (calor, gas, radiación), la efectividad del proceso de esterilización, las condiciones del proceso de esterilización, (temperatura, tiempo, humedad relativa, concentración de gas, etc) la resistencia de tal manera que cuando es utilizado bajo características de operación represente un desafío al proceso. De acuerdo al microorganismo se debe respetar las condiciones de esterilización establecidas por el fabricante y por el proceso validado por el usuario.		
El indicador biológico comúnmente usado en la esterilización por calor húmedo son las esporas de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (ATCC 12980 o		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
ATCC 7953), cuyos valores reportados de $D_{121^{\circ}\text{C}}$ están en el intervalo de 1.5 min a 4.5 min, dependiendo de las condiciones de esporulación, mientras que en la esterilización por calor húmedo de líquidos acuosos se utiliza <i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 7955), <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 35021) o <i>Bacillus atrophaeus</i> (ATCC 9372). Para la esterilización por calor seco, donde la transferencia de calor es menos efectiva y la distribución de la temperatura es menos homogénea que en la esterilización por calor húmedo, usualmente se emplea <i>B. atrophaeus</i> (ATCC 9372) que tiene valores reportados de $D_{160^{\circ}\text{C}}$ en el intervalo de 1 a 5 min. En la esterilización con óxido de etileno es también recomendable el uso de <i>B. atrophaeus</i> (ATCC 9372), considerando que la cuenta viable de esporas debe ser mayor a 10^6 y que el valor reportado de D corresponda a este proceso de esterilización.		
El funcionamiento del indicador biológico depende, de las esporas viables como de su resistencia al proceso de esterilización. Es importante, mantener su interdependencia a través de su periodo de vigencia. Un indicador biológico preparado a partir de esporas que se pretende utilizar, requiere que el valor D aplicado se determine por la cuantía de la reducción de esporas viables.		
PRUEBAS DE RESISTENCIA PARA INDICADORES BIOLÓGICOS		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
En todas las pruebas descritas en esta sección y en la sección de pureza se debe de trabajar en condiciones asépticas, usando cuando sea necesario material estéril. Emplear aparatos de características termodinámicas conocidas, que han sido validadas de acuerdo con los requisitos de seguridad y operación como son: prevención de choques eléctricos, explosiones de gas y quemaduras.		
Evaluar al indicador biológico en una cámara de esterilización equipada con un dispositivo que caliente el aire contenido en ella, preferentemente por medios eléctricos y que disponga de un equipo mecánico de ventilación para que la temperatura sea la misma en toda la cámara, la cual tiene sensores de temperatura y de tiempo. El diseño de la fuente de calor es de tal manera que permita que el indicador biológico se caliente bajo las condiciones específicas. El perfil de temperatura es conocido e identificar las zonas en las cuales la temperatura no sea la especificada. El intervalo de temperatura en la cámara de esterilización es de 40 a 300 °C con variaciones no mayores a 2 °C. El equipo tiene una puerta de acceso adicional para permitir la entrada o salida de muestras en 6 s, de tal manera que cuando la temperatura sea de 120 a 190 °C y se abra el acceso, ésta regresa a la original dentro de 30 s y si la temperatura especificada es de 220 °C o mayor, se recupera en un minuto.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
1. Determinación de tiempo de sobrevivencia y tiempo de muerte. Tomar 200 muestras del indicador biológico en su empaque individual y repartirlos en números iguales en dos o cuatro recipientes adecuados, distribuirlos en la cámara de esterilización en una posición específica para que estén expuestos a las condiciones de esterilización establecidas. Calibrar la cámara de esterilización previamente a su uso, con los recipientes pero sin muestras, precalentándola y operando la unidad durante por lo menos 60 min. Para realizar la prueba, precalentar la cámara a la temperatura especificada y mantener ésta durante 30 min. Colocar uno dos de los recipientes con 100 muestras en total del indicador biológico y continuar la operación del aparato. Comenzar a tomar el tiempo de exposición en el momento en que la temperatura sea 0.5 °C por debajo de la temperatura especificada. Por ejemplo: para 106 esporas por tira con una temperatura de esterilización de 160 ± 5 °C y un valor D de 1.6 min, el tiempo de exposición es de 5 min. Extraer el o los recipientes con las muestras. Para determinar el tiempo de muerte, repetir el procedimiento inmediatamente o con un precalentamiento semejante al mencionado anteriormente si ha transcurrido un periodo considerable con las otras 100 muestras no expuestas, pero para el ejemplo dado por un periodo de 16 min, en vez de los 5 min, anteriormente empleados terminado el ciclo de		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
prueba antes de transcurrir 4 h, sembrar individualmente las muestras en tubos que contengan 10 mL de caldo de soya tripticaseína (MGA 0381). Incubar los tubos entre 30 y 35 °C, observarlos diariamente hasta completar siete días de incubación. La prueba es satisfactoria si todos los tubos sembrados con las muestras expuestas para determinar el tiempo de sobrevivencia muestran crecimiento específico de <i>Bacillus subtilis</i> subespecie <i>niger</i> y si ninguno de los tubos inoculados con las tiras empleadas para determinar el tiempo de muerte, presentan crecimiento.		
2. Determinación del valor D. Dividir 100 muestras del indicador biológico en 10 grupos iguales. Colocar cada grupo en recipientes adecuados de tal manera que las muestras estén expuestas a las condiciones de esterilización establecidas, en una localización específica dentro de una cámara de esterilización previamente calibrada (véanse pruebas de resistencia) con recipientes vacíos. Seleccionar los tiempos de exposición tomando en cuenta: la concentración de esporas, el valor D y la temperatura indicados en la etiqueta, estos tiempos se incrementan para formar una serie tal como: 0.5; 1; 2; 3; 5; 6 min, extendiéndose más allá del tiempo estimado total de extinción de la viabilidad. El incremento de los tiempos de exposición puede modificarse con la limitación de que no haya menos de tres puntos con crecimiento, cubriendo un intervalo no menor a tres		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
valores D aplicados a partir del punto de sobrevivencia correspondiente a un logaritmo abajo del tiempo cero (cuenta de esporas en las tiras sin exponer), graficados en un curva de muerte térmica. Precalentar la cámara durante 30 min, introducir el primer recipiente con 10 indicadores y continuar la operación del aparato. Tomar el tiempo de exposición cuando la temperatura de la cámara sea 0.5 °C menor de la temperatura especificada, después de que el primer grupo de indicadores ha sido expuesto, extraer el recipiente con las muestras y repetir el procedimiento con los 9 grupos restantes exponiendo cada grupo a igual temperatura pero a diferentes tiempos. Para conocer el número de microorganismos sobrevivientes, realizar a cada tira expuesta una "determinación de población viable total", tomando en cuenta que en los grupos de tiempo de exposición prolongados, se supone que se encontrará un número reducido de microorganismos, por lo que se realizarán menos diluciones o se extraen las esporas en menor cantidad de agua (menos de 10 mL) para que se obtenga un número estadísticamente representativo de UFC (unidades formadoras de colonias), entre 30 y 300 por caja. Calcular el promedio de microorganismos sobrevivientes para cada tiempo de exposición. Construir la gráfica logaritmo base 10 de los microorganismos sobrevivientes en el eje de las ordenadas contra el tiempo de exposición en el eje de las abscisas o determinar la relación matemáticamente ajustando a una línea recta y		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
calculando la linealidad. El valor D representa el tiempo medio de exposición requerido para reducir el número de microorganismos en un 90 % (un logaritmo). La variación de valor D no es mayor de ± 20 % del valor establecido en la etiqueta.		
3. Determinación de la población viable total.		
Tomar tres muestras del indicador biológico y proceder como se indica en "determinación de población viable total" para indicadores biológicos en tiras de papel para vapor, con la diferencia de que la temperatura de incubación es de 30 a 35 °C. Calcular el número promedio de esporas por muestra, este valor no es menor al indicado en la etiqueta ni mayor al 300 %.		
A. PRUEBA DE IDENTIDAD		
Verificar que el microorganismo empleado como indicador biológico cumple con las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas características de la cepa, por ejemplo:		
<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372; al microscopio, es un bacilo Gram positivo de 0.7 a 0.8 micras de ancho por 2 a 3 micras de longitud, con endosporas ovales y centrales que no deforman a la célula.		
Cuando se cultiva entre 30 y 35 °C en aerobiosis en un medio adecuado, el crecimiento se presenta en 24 h, las colonias tienen apariencia opaca y pueden ser de color crema o ligeramente naranja,		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
cuando se incubaba en caldo nutritivo se forma una película en la superficie ligeramente naranja. Realizar las pruebas bioquímicas correspondientes para su identidad.		
<i>Bacillus stearothermophilus</i> es un bacilo Gram positivo con endospora—subterminal. Cuando se transfiere un inóculo del crecimiento obtenido en caldo nutritivo, incubado por 17 h, a medios apropiados e incubados entre 55 y 60 °C por 24 h en condiciones aeróbicas, se obtendrá un crecimiento óptimo. Realizar las pruebas bioquímicas correspondientes para su identidad. Alternativamente puede emplearse un método de identificación automatizado.		
B. PRUEBAS DE PUREZA 1. Presencia de otros microorganismos. Verificar la ausencia de otros microorganismos por medio de la observación microscópica de frotis teñidos por Gram (<u>MGA 0921.Tinciones Bacterianas</u>). 2. Límite de formas vegetativas. Tomar 3 muestras del indicador biológico y proceder como se indica en " prueba para la determinación de cuenta viable " descrita a continuación, con la excepción de calentar la alícuota de la suspensión en un baño de agua. El número promedio de cuenta viable en la porción calentada no debe ser menor del 90 % del		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
mínimo obtenido en la cuenta viable para la porción sin calentar.		
C. PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CUENTA VIABLE TOTAL Preparación de la muestra. Proceder como se indica a continuación considerando el tipo de indicador del que se trate. Indicadores en portador inerte como papel o fibra. Tomar al menos cuatro muestras y retirar el empaque individual, en un recipiente estéril que contenga 100 mL de agua estéril, depositar las tiras y disgregarlas mecánicamente con apoyo de perlas de vidrio hasta lograr una suspensión homogénea.		
Indicadores autocontenidos. Vaciar asépticamente el contenido de cuatro contenedores en un recipiente con 100 mL de agua estéril, mezclar hasta lograr una suspensión homogénea. Suspensión de esporas de indicadores biológicos. Preparar una dilución apropiada utilizando como diluyente agua estéril, seguir las indicaciones de recuento como se indica a continuación.		
Recuento de esporas. Transferir una alícuota de 10 mL a un tubo estéril. Para microorganismos formadores de esporas termófilos, calentar el tubo que contiene la suspensión en un baño de agua de 95 a 100 °C		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
durante 15 minutos. Para microorganismos no termófilos calentar el tubo en un baño de agua de 80 a 85 °C durante 10 minutos. Enfriar rápidamente las suspensiones en un baño de agua con hielo (0 a 4 °C). Transferir dos alícuotas de 1 mL y hacer las diluciones para obtener de 30 a 300 colonias por placa. Inocular 1 mL de cada dilución seleccionada en una caja Petri y adicionar 20 mL de agar soya tripticaseína fundido y enfriado a 45 °C, sin que pasen más de 20 minutos después de haber puesto la alícuota. Homogeneizar y dejar solidificar. Incubar de 55 a 60 °C cuando se trate de microorganismos termófilos y de 30 a 35 °C para microorganismos no termófilos, o bien a la temperatura de recuperación óptima indicada por el fabricante. Después de 48 horas revisar las cajas Petri, contar el número de colonias recuperadas y calcular el número promedio de esporas por muestra. Al evaluar indicadores biológicos adquiridos comercialmente, el recuento de esporas viables debe estar entre 50 y 300% del valor declarado por el fabricante.		
D. PRUEBAS DE RESISTENCIA. Aparatos utilizados para las pruebas Esterilización por calor seco. La cámara de esterilización debe estar equipada con un dispositivo que caliente el aire contenido en ella, preferentemente por medios eléctricos y que disponga de un equipo mecánico de ventilación para que la temperatura sea la misma en toda la cámara,		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
la cual tiene sensores de temperatura y de tiempo. El diseño de la fuente de calor es de tal manera que permita que el indicador biológico se caliente bajo las condiciones específicas. El perfil de temperatura es conocido y se deben identificar las zonas en las cuales la temperatura no es la especificada. El intervalo de temperatura en la cámara de esterilización es de 40 a 300 °C con variaciones no mayores a 2 °C. El equipo tiene una puerta de acceso adicional para permitir la entrada o salida de muestras en 6 s, de tal manera que cuando la temperatura este entre 120 y 190 °C y se abra el acceso, para que ésta regrese a la original en no más de 30s, y si la temperatura especificada es de 220 °C o mayor, se recupera en un minuto.		
Esterilización por vapor. La cámara debe estar provista de dispositivos que permitan verificar y controlar la temperatura, el tiempo y la presión de vapor. El contenido de aire dentro de la cámara es reemplazado completamente por vapor en un máximo de 10s, hasta alcanzar una temperatura de 121.5 ± 0.5 °C con la correspondiente presión de vapor saturado, cuando la cámara se vacía se alcanza la presión atmosférica en no más de 5s. El diseño de la cámara es tal que el contenido pueda extraerse en no más de 5s una vez evacuado el vapor.		
La cámara se calibra con termopares u otros dispositivos distribuidos adecuadamente para constatar que la temperatura en diferentes puntos tiene una uniformidad de ± 0.5 °C. La presión de		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
vapor saturado es verificable y controlable de manera que el valor elegido sea de 204.8 kPa equivalentes a 1,536 mm de mercurio con una precisión de ± 3.45 kPa (± 25.88 mm de mercurio). Los tiempos especificados se miden con un reloj que registre intervalos de un segundo.		
Esterilización por óxido de etileno. El equipo debe asegurar una mezcla adecuada del gas esterilizante y un calentamiento de este a una temperatura no mayor a la previamente seleccionada, de manera que no entre líquido a la cámara de prueba. En consecuencia, la cámara se halla equipada con un dispositivo para calentar, verificar y controlar la temperatura, la presión, la humidificación y la concentración de gas, con la finalidad que bajo las condiciones especificadas de temperatura, presión y humedad, el tiempo para alcanzar la concentración de gas seleccionada no sea mayor de 1 min, el tiempo para evacuar la cámara de prueba no es mayor de 1 min, y la cantidad de gas administrada en la cámara de prueba sea tal que la mezcla gaseosa alcance una concentración de 600 mg/L, con una variación no mayor a ± 5 %. El dispositivo para verificar la temperatura tiene la capacidad de determinar una temperatura con variación de ± 0.5 °C. El aparato está provisto de un dispositivo o dispositivos apropiados para verificar la presión, la cual debe ser indicada con una precisión de ± 0.84 kPa (± 6.35 mm de mercurio). Los tiempos especificados se aplican y		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
observan usando dispositivos de operación apropiados, graduados en décimas de segundo.		
PRUEBAS DE PUREZA		
1. Presencia de otros microorganismos. Verificar la ausencia de otros microorganismos por medio de la observación microscópica de frotis teñidos por Gram (MGA-0921). 2. Límite de formas vegetativas. Tomar 3 muestras del indicador biológico y proceder como se indica en "determinación de cuenta viable total" para indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por vapor, con la excepción de calentar la parte alícuota de la suspensión en un baño de agua a 65 °C durante 20 min. El número promedio de cuenta viable en la porción calentada no es menor del 90 % del mínimo obtenido en la cuenta viable para la porción sin calentar.		
ESTABILIDAD Y DESTRUCCIÓN		
Estabilidad. Cuando se realice una cuenta de esporas en las muestras de retención durante su periodo de vigencia, procediendo como se indica en "determinación de cuenta viable total", el número promedio por muestra no es menor al 50 % más alto		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
obtenido en relación con cualquier determinación realizada con anterioridad.		
Destrucción. Antes de descartar los indicadores biológicos, esterilizarlos por vapor durante un tiempo de al menos 30 min a 121 °C o por un método que tenga una letalidad mayor o igual que la de esterilización por vapor. Este método de esterilización se usa para las tiras utilizadas en los procedimientos anteriores.		
INDICADORES BIOLÓGICOS EN TIRAS DE PAPEL PARA ESTERILIZACIÓN POR ÓXIDO DE ETILENO		
Son preparaciones de esporas viables, obtenidas a partir de un cultivo derivado de una cepa específica de <i>Bacillus subtilis</i> subespecie <i>niger</i> impregnadas en una tira de papel de calidad satisfactoria (un papel de calidad adecuada puede ser un papel filtro de velocidad de filtración media, puro y derivado del algodón), empacada individualmente en un recipiente adecuado fácilmente permeable por la mezcla de gas para esterilización por óxido de etileno. Estos indicadores biológicos son empleados para calificar, validar y verificar periódicamente los ciclos de esterilización por óxido de etileno. Si el indicador biológico empleado para la esterilización por óxido de etileno tiene una concentración de esporas declaradas de 5×10^5 esporas a menos de 5×10^6 esporas por tira, y son sujetas a esterilización por óxido de etileno de una mezcla		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
gaseosa que contenga 600 ± 30 mg de óxido de etileno por litro a una temperatura de 54 ± 2 °C con una humedad relativa de 60 ± 10 % (en la subsecuente llamadas las "condiciones específicas") tiene un valor D entre 2.6 y 5.8 min, un tiempo de sobrevivencia no menor de 7.8 min y un tiempo de muerte no mayor de 58 min. Si se tiene otra concentración de esporas declaradas y se sujeta el indicador a esterilización por óxido de etileno bajo las "condiciones específicas", tiene un valor D entre 2.6 y 5.8 min y tiempos de sobrevivencia y muerte que correspondan a los especificados en la <i>tabla 0501.1</i>. Si los indicadores se recomiendan para ser usados con diferentes concentraciones de gas, temperatura y humedad relativa, distintas de las "condiciones específicas", cumplen con las especificaciones de la <i>tabla 0501.1</i> cuando se sujetan a esterilización por óxido de etileno bajo "condiciones específicas". Si el indicador biológico se somete a esterilización por óxido de etileno, bajo otras condiciones, el valor D puede estar fuera del intervalo especificado, pero los tiempos de muerte y de sobrevivencia corresponden a los tiempos dados en la <i>tabla 0501.1</i>. El indicador biológico no contiene un número menor de esporas viables que lo indicado en la etiqueta, y no más del 300 % de dicho valor. La población total viable de la tira contiene por lo menos 90 % de esporas.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
Determinación del valor D 1. Método de la curva de supervivientes. Este método se basa en la recuperación y recuento de los microorganismos sobrevivientes en medio sólido después de la exposición. Utilizar al menos 20 muestras del indicador biológico divididas en 5 grupos que corresponderán a condiciones de exposición diferentes (mínimo 5 tiempos de exposición con mínimo 4 muestras cada uno). Para seleccionar los tiempos de exposición se debe considerar lo siguiente: a) El primer tiempo de exposición corresponde a la muestra no expuesta al agente esterilizante, ya sea por ausencia o por sustitución de éste por un gas inerte (tiempo 0). b) El tiempo final de exposición seleccionado debe considerar que la cantidad de microorganismos sea reducida al 0.01 % del inóculo original. c) Seleccionar 3 tiempos de exposición entre el tiempo cero y el tiempo final, considerando que la diferencia entre ellos sea constante. Colocar cada grupo en recipientes adecuados para su exposición a las condiciones de esterilización establecidas, en una localización específica dentro de una cámara de esterilización en la que previamente se verificaron las condiciones de		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
operación con recipientes vacíos. Introducir el primer recipiente con los indicadores en la cámara de esterilización para la evaluación de indicadores biológicos y operarlo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, de tal forma que cada grupo de indicadores se exponga a los diferentes tiempos establecidos previamente. En caso de que el agente esterilizante deje residuos, éstos se deben neutralizar para evitar que interfiera en la recuperación de los microorganismos sobrevivientes. Para conocer el número de microorganismos sobrevivientes después del tiempo de exposición a las condiciones de esterilización, realizar a cada indicador expuesto la "Determinación de cuenta viable total" sin dejar que pasen más de dos horas a partir de que concluyó el tiempo de exposición.		
Tomando en cuenta que en los grupos de tiempo de exposición prolongados, se supone que se encontrará un número reducido de microorganismos, se realizarán menos diluciones o se extraen las esporas en menor cantidad de agua (menos de 10 mL) para que se obtenga un número estadísticamente representativo de UFC (unidades formadoras de colonias), entre 30 y 300 por caja al realizar el recuento. Calcular el promedio de microorganismos sobrevivientes para cada tiempo de exposición. Construir la gráfica logaritmo base 10 de los microorganismos sobrevivientes en el eje de las ordenadas contra el tiempo de exposición, nivel de dosis u otra variable del proceso de		

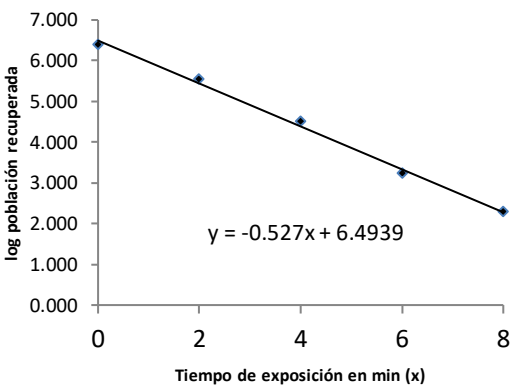


“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*																		
esterilización, en el eje de las abscisas. Obtener la recta de regresión lineal por mínimos cuadrados y asegurar que el coeficiente de determinación no sea menor a 0.8. El valor D es igual al recíproco negativo de la pendiente de la recta y representa el tiempo medio de exposición o nivel de dosis requerido para reducir el número de microorganismos en un 90 % (un logaritmo).																				
$D = -1 \frac{1}{m}$ Ejemplo: <table><tr><th>Tiempo de exposición (min)</th><th>Población recuperada (y)</th><th>log población recuperada</th></tr><tr><td>0</td><td>2.5x10⁶</td><td>6.398</td></tr><tr><td>2</td><td>3.4x10⁵</td><td>5.531</td></tr><tr><td>4</td><td>3.1x10⁴</td><td>4.491</td></tr><tr><td>6</td><td>1.7x10³</td><td>3.230</td></tr><tr><td>8</td><td>1.9x10²</td><td>2.279</td></tr></table>	Tiempo de exposición (min)	Población recuperada (y)	log población recuperada	0	2.5x10 ⁶	6.398	2	3.4x10 ⁵	5.531	4	3.1x10 ⁴	4.491	6	1.7x10 ³	3.230	8	1.9x10 ²	2.279		
Tiempo de exposición (min)	Población recuperada (y)	log población recuperada																		
0	2.5x10 ⁶	6.398																		
2	3.4x10 ⁵	5.531																		
4	3.1x10 ⁴	4.491																		
6	1.7x10 ³	3.230																		
8	1.9x10 ²	2.279																		
Regresión lineal <u>Estadísticas de la regresión</u> Coeficiente de correlación múltiple 0.998 Coeficiente de determinación R ² 0.997 R ² ajustado 0.995 Error típico 0.114																				



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
Observaciones 5 Intercepción 6.494 - Tiempo de exposición en min (x) 0.527		
 Cálculo del valor D $D = -1 \frac{1}{m} = -1 \frac{1}{-0.527} = 1.9 \text{ min}$		
2. Método de la fracción negativa. Este método se basa en la determinación indirecta de microorganismos sobrevivientes al proceso de esterilización por inoculación de un medio líquido para detectar la presencia o ausencia de crecimiento, para ello se exponen grupos de		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
muestras de prueba a diferentes tiempos o unidades de dosis, en las que se espera que una fracción de ellas no presente crecimiento. Este método es útil cuando el número de UFC recuperadas es menor a 5.		
Usar 20 muestras de prueba sometidas a 5 condiciones de exposición diferentes, para tener un total de 100 muestras, el cual se considera el número mínimo a evaluar. De estas condiciones de exposición se espera que en una se tenga una respuesta totalmente positiva, es decir, que todas las muestras expuestas presenten crecimiento después de la incubación, en dos condiciones más, se espera una respuesta parcialmente positiva y en otras dos una respuesta totalmente negativa, es decir, que no haya crecimiento en ninguna de las muestras expuestas, para lograr obtener estas respuestas, el intervalo de condiciones de exposición va de no menos de un valor D por debajo del tiempo de sobrevivencia hasta no menos de un valor D por encima del tiempo de muerte indicado por el fabricante. Colocar cada grupo de muestras en recipientes adecuados que permitan exponer los indicadores a la condición de esterilización indicada en una ubicación específica en la cámara de esterilización. Previamente verificar las condiciones de operación con recipientes vacíos. Seleccionar los tiempos o unidades de dosis de exposición para las muestras a analizar de tal forma que vayan en aumento a partir del tiempo más breve, considerando que las diferencias entre estos		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
tiempos deben ser constantes y no mayores al 75 % del valor de D esperado.		
Operar la cámara de esterilización para evaluación de indicadores biológicos de acuerdo a las instrucciones del fabricante y las características específicas del indicador biológico y exponer los indicadores a las condiciones de esterilización seleccionadas. Una vez concluida la exposición cada indicador se transfiere asépticamente a un tubo que contenga un volumen adecuado del medio de cultivo (Puede usarse como guía el <u>MGA 0381.Esterilidad</u> o la información proporcionada por el fabricante de los indicadores biológicos).		
El volumen de medio debe ser el mismo para cada réplica. En el caso de los indicadores biológicos autocontenidos la tira de papel se pone en contacto con el medio de cultivo contenido en el envase. Incubar a la temperatura de recuperación óptima para el microorganismo durante 7 días observando diariamente si hay presencia de crecimiento. Al día 7 de incubación registrar los resultados como el número de indicadores que no presentan crecimiento. Para determinar el valor D se utiliza el modelo Holcomb-Spearman-Karber limitado, esto considerando que en el método descrito las condiciones de exposición, expresadas como tiempos o dosis, difieren en un intervalo constante y el número de réplicas que se exponen a cada condición es idéntico en cada caso.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
$D = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$ N_0= Promedio de la cuenta viable inicial del microorganismo U_{HSK}= Tiempo medio para la esterilidad Para calcular el tiempo medio para la esterilidad utilizar la siguiente fórmula: $U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$ U_k = Primer tiempo de exposición o unidad de dosis a la cual ninguna replica presenta crecimiento d = Intervalo de tiempo o unidad de dosis entre exposiciones n= número de réplicas en cada exposición $\sum_{i=1}^{k-1} r_i$ = Suma del número de replicas sin crecimiento Ejemplo de cálculos: Se tiene un $N_0 = 1 \times 10^6$, un intervalo de tiempo de exposición constante de 2 minutos y después de la		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*																		
incubación se obtienen los resultados mostrados en la siguiente tabla: Tabla 0501.1.- Tiempo de exposición de fracción negativa. <table><tr><th>Tiempo de exposición al agente esterilizante (min)</th><th>Número de muestras expuestas</th><th>Número de muestras de sin crecimiento</th></tr><tr><td>20 (U_i)</td><td>20</td><td>0</td></tr><tr><td>22</td><td>20</td><td>7</td></tr><tr><td>24 (U_{k-1})</td><td>20</td><td>15</td></tr><tr><td>26 (U_k)</td><td>20</td><td>20</td></tr><tr><td>28</td><td>20</td><td>20</td></tr></table>	Tiempo de exposición al agente esterilizante (min)	Número de muestras expuestas	Número de muestras de sin crecimiento	20 (U _i)	20	0	22	20	7	24 (U _{k-1})	20	15	26 (U _k)	20	20	28	20	20		
Tiempo de exposición al agente esterilizante (min)	Número de muestras expuestas	Número de muestras de sin crecimiento																		
20 (U _i)	20	0																		
22	20	7																		
24 (U _{k-1})	20	15																		
26 (U _k)	20	20																		
28	20	20																		
Se obtiene el tiempo medio para la esterilidad $U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$ U_k=26 d=2 n=20																				



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
$U_{HSK} = 26 - \frac{2}{2} - \frac{2}{20} (0 + 7 + 15)$ $= 22.8 \text{ min}$		
Posteriormente se calcula el valor D $D = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} No + 0.2507} = \frac{22.8}{6.0 + 0.2507}$ $= 3.6 \text{ min}$ Con este modelo se puede además calcular la varianza, la desviación estándar y los límites de confianza. $V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i)$ Sustituyendo $V = \frac{2^2}{20^2(20-1)} \times [(7 \times 13) + (15 \times 5)]$ $= 0.09$ $SD = \sqrt{V}$ Sustituyendo $SD = \sqrt{0.09} = 0.30$		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
Límites de confianza (p=0.05) $D_{calc} = D \pm 2SD$ Límite inferior $D_{calc} = \frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10} No + 0.2507}$ $= \frac{22.8 - 2(0.30)}{6.0 + 0.2507} = 3.55 \text{ min}$ Límite superior $D_{calc} = \frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10} No + 0.2507}$ $= \frac{22.8 + 2(0.30)}{6.0 + 0.2507} = 3.74 \text{ min}$		
EMPAQUE Y CONSERVACIÓN. Cumple con lo establecido en "Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco".		
FECHA DE CADUCIDAD. Cumple con lo establecido en "Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco".		
ETIQUETADO. Cumple con lo establecido en "Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco" con la diferencia de que la etiqueta indica que son indicadores		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
biológicos para ser utilizados en esterilización por óxido de etileno.		
IDENTIFICACIÓN. El microorganismo empleado como indicador biológico cumple con las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas de la cepa de <i>Bacillus subtilis</i> subespecie <i>niger</i> correspondiente a la cepa ATCC 9372; al microscopio, es un bacilo Gram positivo de 0.7 a 0.8 µm de anchura por 2 a 3 µm de longitud, con endosporas ovales y centrales que no deforman a la célula. Cuando se cultiva entre 30 y 35 °C en aerobiosis en un medio adecuado, el crecimiento se presenta en 24 h y un medio similar inoculado al mismo tiempo pero incubado entre 55 y 60 °C no muestra evidencia de crecimiento en el mismo período, en agar las colonias tienen apariencia opaca y pueden ser de color crema o ligeramente café, cuando se incuba en caldo nutritivo se forma una película en la superficie y puede presentar turbidez ligera o no presentarla. Algunas de sus reacciones bioquímicas son: forma un pigmento negro a partir de la tirosina, licua la gelatina, utiliza citrato pero no propionato ni hipurato, reduce el nitrato e hidroliza tanto el almidón como a la glucosa sin producción de gas, muestra una reacción positiva a la catalasa y a la prueba de Vogues-Proskauer.		
PRUEBAS DE RESISTENCIA. En todas las pruebas descritas en esta sección y en la sección de <i>Pureza</i> trabajar en condiciones asépticas, usando cuando sea necesario material estéril.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
Evaluar al indicador biológico en una cámara que cuente con medios para asegurar una mezcla adecuada del gas esterilizante y un calentamiento del mismo a una temperatura no mayor a la previamente seleccionada, de manera que no entre líquido a la cámara de prueba. En consecuencia, la cámara se halla equipada con un dispositivo para calentarla y para verificar y controlar la temperatura, la presión, la humidificación y la concentración de gas, con la finalidad que bajo las condiciones especificadas de temperatura, presión y humedad, el tiempo para alcanzar la concentración de gas seleccionada no sea mayor de 1 min, el tiempo para evacuar la cámara de prueba no es mayor de 1 min, y la cantidad de gas administrada en la cámara de prueba sea tal que la mezcla gaseosa alcance una concentración de 600 mg/L, con una variación no mayor a $\pm 5\%$. El dispositivo para verificar la temperatura tiene la capacidad de determinar una temperatura con variación de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. El aparato está provisto de un dispositivo o dispositivos apropiados para verificar la presión, que indiquen la presión del recipiente con una precisión de $\pm 0.84\text{ kPa}$ ($\pm 6.35\text{ mm de mercurio}$). Los tiempos especificados se aplican y observan usando dispositivos de operación apropiados, graduados en décimas de segundo.		
1. Determinación de tiempos de sobrevivencia y de muerte. Tomar 200 muestras del indicador biológico en su empaque individual, repartirlas		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del pueblo”

Dice	Debe decir	Justificación*
en números iguales en dos o cuatro recipientes adecuados, distribuirlos en una posición específica para que estén expuestos a las condiciones de esterilización establecidas. Purgar la cámara cinco veces, evacuando cada vez, hasta una presión no mayor de 100 ± 3 mm de mercurio con los recipientes en su lugar pero sin muestras. Proceder como se ha indicado para la combinación de concentración de gas, temperatura y humedad relativa; por ejemplo para las "condiciones específicas", precalentar y regular la temperatura a 54 ± 2 °C iniciar la operación y la verificación de los pasos 1 a 5, que se detallan posteriormente. En el paso 4 inyectar gas el tiempo suficiente, para el ejemplo dado no menos de 7.8 min. Colocar inmediatamente él o los recipientes con los indicadores biológicos en la cámara de prueba y continuar como sigue: 1. Mantener las muestras a 54 ± 2 °C durante 5 min. 2. Evacuar la cámara de esterilización hasta tener una presión de no más de 100 ± 3 mm de mercurio. 3. Inyectar suficiente vapor de agua a la cámara (por ejemplo vapor saturado), hasta alcanzar una humedad relativa de 60 ± 10 %. 4. Inyectar suficiente óxido de etileno calentado a una temperatura regulada		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
para obtener una concentración dentro de la cámara de 600 ± 30 mg de óxido de etileno/L concentración de gas apropiada para el ejemplo dado, mantener la temperatura y humedad durante 7.8 min. 5. Evacuar la cámara de esterilización a una presión de $250 \text{ mg} \pm 3 \text{ mm}$ de mercurio, romper el vacío con aire esterilizado por filtración. Repetir esta operación tres veces y retirar el o los recipientes con las muestras expuestas. 6. Repetir los pasos de 1 al 5 con el o los recipientes no expuestos, pero manteniendo las condiciones mencionadas en el punto 4 por un tiempo apropiado. Para el ejemplo dado son 58 min. Terminado el ciclo de prueba y antes de transcurrir 4 h, sembrar individualmente las muestras, en tubos que contengan 10 mL de caldo de soya tripticaseína (MGA 0381). Incubar los tubos entre 30 y 35°C y observarlos diariamente hasta completar siete días. La prueba es satisfactoria si todos los tubos sembrados con las muestras expuestas para determinar el tiempo de sobrevivencia muestran crecimiento específico de <i>Bacillus subtilis</i> subespecie <i>niger</i>, y si ninguno de los tubos inoculados con las tiras empleadas para determinar el tiempo de muerte presentan crecimiento.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
2. Determinación del valor D. Proceder como se indica en <i>Determinación de valor D para indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco</i>, hasta “previamente calibrada con recipientes vacíos”. Repetir los pasos del 4 al 5 de determinación de tiempos de sobrevivencia y muerte, con diferentes grupos de muestras, pero exponiendo cada grupo a una serie de tiempos de exposición como 3, 5, 7, 10, 15, 20 min, etc. Para establecer la cuenta de esporas en el tiempo cero, exponer otro grupo de muestras a las mismas condiciones de esterilización, pero excluyendo el paso 4 (sin la inyección de gas). El incremento de los tiempos de exposición puede modificarse con la limitación de que no haya menos de tres puntos con crecimiento, cubriendo un intervalo de tres valores D aplicados a partir del punto de sobrevivencia correspondiente a un logaritmo abajo del tiempo cero, (cuentas de tiras sin exponer), graficado en una curva de tiempo-sobrevivencia. Proceder como se indica en <i>Determinación de valor D para indicadores biológicos en tiras de papel para calor seco</i>.		
3. Determinación de la cuenta viable total. Proceder como se indica en <i>Determinación</i>		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
de cuenta viable total para indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por vapor empezando en "disgregarlos en un equipo", con la diferencia de que los medios inoculados se incuban de 30 a 35 °C.		
DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE SOBREVIVENCIA Y TIEMPO DE MUERTE		
La confirmación del tiempo de sobrevivencia y el tiempo de muerte, permite asegurar su correcto desempeño este dato debe ser proporcionado por el fabricante. Cuando no se dispone de esta información se puede usar el valor D calculado para establecer valores de tiempo de muerte y de sobrevivencia significativos, de acuerdo a lo siguiente: El tiempo de sobrevivencia debe ser $> ((\log_{10} N_0) - 2) (D)$ El tiempo de muerte debe ser $< ((\log_{10} N_0) + 4) (D)$ Proceder como se indica a continuación dependiendo del proceso de esterilización.		
Esterilización por calor seco. Tomar al menos 10 muestras del indicador biológico de forma individual y distribuir en la cámara en una posición específica para que estén expuestos a las condiciones de esterilización establecidas. Ajustar la temperatura		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
de la cámara, precalentando durante por lo menos 60 min. Después de este tiempo colocar los indicadores biológicos para realizar la prueba y mantener la temperatura establecida durante 30 min, contados a partir que la temperatura esté 0.5 °C por debajo de la temperatura especificada.		
Para determinar el tiempo de muerte, repetir el procedimiento inmediatamente con un precalentamiento semejante al mencionado anteriormente con al menos 10 muestras, considerando para la exposición el tiempo de muerte indicado por el fabricante. Antes de transcurrir 4 h, sembrar individualmente las muestras en tubos que contengan 10 mL de caldo de soya tripticaseína (<u>MGA 0381.Esterilidad</u>).		
Incubar los tubos entre 30 y 35 °C, observar diariamente hasta completar siete días de incubación. Para determinar el tiempo de supervivencia la prueba es satisfactoria, si todos los tubos sembrados presentan crecimiento de <i>Bacillus atrophaeus</i> (o el microorganismo utilizado como indicador). Para determinar el tiempo de muerte la prueba es satisfactoria, si los tubos inoculados presentan ausencia de crecimiento.		
Esterilización por óxido de etileno. Tomar el número de indicadores en relación al tamaño de la cámara de acuerdo a la tabla 2 tanto para tiempo de supervivencia y muerte, distribuir en una posición específica para que estén expuestos a las condiciones de esterilización establecidas. Purgar la cámara cinco veces, evacuando cada vez, hasta		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
una presión no mayor de 100 ± 3 mm de mercurio con los recipientes en su lugar pero sin muestras.		
Proceder como se ha indicado para la combinación de concentración de gas, temperatura y humedad relativa; por ejemplo para las "condiciones específicas", precalentar y regular la temperatura a 54 ± 2 °C iniciar la operación y la verificación de los pasos 1 a 5, que se detallan posteriormente. En el paso 4 inyectar gas el tiempo suficiente, para el ejemplo dado no menos de 7.8 min. Colocar inmediatamente él o los recipientes con los indicadores biológicos en la cámara de prueba y continuar como sigue:		
1. Mantener las muestras a 54 ± 2 °C durante 5 min. 2. Evacuar la cámara de esterilización hasta tener una presión de no más de 100 ± 3 mm de mercurio. 3. Inyectar suficiente vapor de agua a la cámara (por ejemplo vapor saturado), hasta alcanzar una humedad relativa de 60 ± 10 %. 4. Inyectar suficiente óxido de etileno calentado a una temperatura regulada para obtener una concentración dentro de la cámara de 600 ± 30 mg de óxido de etileno/L concentración de gas apropiada para el ejemplo dado, mantener la temperatura y humedad durante 7.8 min. 5. Evacuar la cámara de esterilización a una presión de $250 \text{ mg} \pm 3$ mm de mercurio, romper el vacío con aire esterilizado por filtración. Repetir esta operación tres veces y retirar el o los recipientes con las muestras expuestas.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*														
6. Repetir los pasos de 1 al 5 con el o los recipientes no expuestos, pero manteniendo las condiciones mencionadas en el punto 4 por un tiempo apropiado. Para el ejemplo dado son 58 min.																
Terminado el ciclo de prueba, airear y antes de 4 h, sembrar individualmente las muestras, en tubos que contengan 10 mL de caldo de soya tripticaseína (MGA 0381.Esterilidad). Incubar los tubos entre 30 y 35 °C y observar diariamente hasta completar siete días. Para determinar el tiempo de supervivencia la prueba es satisfactoria, si todos los tubos sembrados presentan crecimiento de <i>Bacillus atrophaeus</i> (o el microorganismo utilizado como indicador). Para determinar el tiempo de muerte la prueba es satisfactoria, si los tubos inoculados presentan ausencia de crecimiento.																
Tabla 0501.2. – Ejemplos del número mínimo recomendado de Indicadores Biológicos.																
<table><tr><th>Volumen de la carga de producto m³</th><th>Número de Indicadores Biológicos</th></tr><tr><td>≤ 1</td><td>5</td></tr><tr><td>10</td><td>30</td></tr><tr><td>15</td><td>35</td></tr><tr><td>20</td><td>40</td></tr><tr><td>25</td><td>45</td></tr><tr><td>30</td><td>50</td></tr></table>			Volumen de la carga de producto m³	Número de Indicadores Biológicos	≤ 1	5	10	30	15	35	20	40	25	45	30	50
Volumen de la carga de producto m³	Número de Indicadores Biológicos															
≤ 1	5															
10	30															
15	35															
20	40															
25	45															
30	50															



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice		Debe decir	Justificación*
35	55		
40	60		
50	70		
100	120		
Esterilización por vapor. Tomar al menos 10 muestras del indicador biológico, distribuir en la cámara de esterilización en una posición específica para que estén expuestos a las condiciones de esterilización establecidas. Ajustar los parámetros de esterilización previo a su uso. Para realizar la prueba, precalentar la cámara a la temperatura especificada, mantener ésta durante 5 min. Dejar enfriar la cámara y abrir la puerta, introducir inmediatamente los recipientes con las muestras, esta operación no debe durar más de 5 s. Aumentar la presión hasta obtener la temperatura deseada y mantener ésta durante el tiempo seleccionado. El periodo de exposición para la determinación de los tiempos de sobrevivencia y de muerte es indicado por fabricante o se selecciona dependiendo de la concentración de esporas y el valor D como se indicó anteriormente, una vez que transcurre la exposición al tiempo de sobrevivencia, la cámara es enfriada lo más rápidamente posible, y el o los recipientes con las 50 muestras se extraen. Para determinar el tiempo de muerte, repetir el procedimiento inmediatamente con otras 50 -muestras, en caso de ser necesario precalentar la cámara.			



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
Terminado el ciclo de prueba y antes de transcurrir 4- h, sembrar las muestras en tubos que contengan 10- mL de caldo de soya-tripticaseína (<u>MGA 0381.Esterilidad</u>).		
Incubar los tubos entre 55 -y 60- °C (en caso de que se use <i>Geobacillus stearothermophilus</i>) y observarlos diariamente, hasta completar siete días de incubación. Para determinar el tiempo de supervivencia la prueba es satisfactoria, si todos los tubos sembrados presentan crecimiento de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (o el microorganismo utilizado como indicador). Para determinar el tiempo de muerte la prueba es satisfactoria, si los tubos inoculados presentan ausencia de crecimiento.		
Si en la prueba de sobrevivencia del total de indicadores expuestos muestra al menos un resultado negativo (ausencia de crecimiento), o en la prueba de muerte del total de indicadores expuestos muestra al menos un resultado positivo (presencia de crecimiento), se deben analizar con el doble de muestras para confirmar que no hay resultados inesperados y poder confirmar los tiempos de sobrevivencia y muerte.		
PRUEBAS DE PUREZA 1. Presencia de contaminación por otros microorganismos. Verificar la ausencia de otros microorganismos por medio de la observación		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
microscópica de frotis teñidos por Gram (MGA-0921). 2. Límite de formas vegetativas. Tomar tres muestras del indicador biológico y proceder como se indica en la prueba de Límite de formas vegetativas para indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por vapor, con la diferencia de que el matraz que contenga la parte alícuota de la suspensión se calienta en un baño de agua a 65 °C durante 20 min. El número promedio de cuenta viable en la porción calentada no es menor del 90 % del número obtenido en la cuenta viable para la porción sin calentar.		
ESTABILIDAD Y DESTRUCCIÓN. Proceder como se indica en "estabilidad y destrucción para indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco".		
INDICADORES BIOLÓGICOS EN TIRAS DE PAPEL PARA ESTERILIZACIÓN POR VAPOR. Son preparaciones de esporas viables obtenidas a partir de un cultivo derivado de una cepa específica de <i>Bacillus stearothermophilus</i> impregnadas en una tira de papel de calidad satisfactoria (un papel de		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
calidad apropiada puede ser un papel filtro de velocidad de filtración media, puro y derivado del algodón) empacadas individualmente en un recipiente adecuado fácilmente permeable por el vapor, la cepa se caracteriza por su resistencia a la esterilización por vapor. Estos indicadores son empleados para calificar, validar y verificar periódicamente ciclos de esterilización por vapor. Si el indicador biológico tiene una concentración de esporas declarada de 5×10^5 esporas a menos de 5×10^6 esporas por tira y se sujeta a condiciones de esterilización por vapor a $121 \pm 0.5^\circ\text{C}$ tiene un valor D entre 1.3 y 1.9 min, un tiempo de sobrevivencia no menor 3 min y un tiempo de muerte no mayor a 19 min. Si se tiene otra concentración de esporas declarada y se sujeta el indicador a esterilización por vapor de $121 \pm 0.5^\circ\text{C}$ tiene un valor D entre 1.3 y 1.9 min y los tiempos de muerte y de sobrevivencia que corresponden a los especificados en la tabla 0501.1 para varias concentraciones de esporas. Si los indicadores son recomendados para temperaturas de esterilización diferentes a $121 \pm 0.5^\circ\text{C}$		
EMPAQUE Y CONSERVACIÓN. Cumple lo establecido en Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor.		
FECHA DE CADUCIDAD. Cumple lo establecido en Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
ETIQUETADO. Cumple lo establecido en Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco con la diferencia de que el marbete establece que se trata de indicadores biológicos para ser utilizados en esterilización por vapor.		
IDENTIFICACIÓN. Al microscopio, la cepa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> son bacilos Gram positivos con endosporas ovaes, subterminales que deforman a la célula. Cuando se transfiere un inóculo del crecimiento obtenido en caldo nutritivo, incubado durante 17 h a medios sólidos apropiados, se presenta crecimiento óptimo en incubación aeróbica por 24 h entre 55 y 60 °C. El indicador biológico manifiesta las pruebas bioquímicas siguientes: reacción positiva a la catalasa, no utiliza el citrato, el propionato, ni el hipurato pero si reduce al nitrato, no licua la gelatina y la prueba de Vogues Proskauer es negativa.		
ESTABILIDAD Y DESTRUCCIÓN		
Estabilidad. Cuando se realice una cuenta de esporas en las muestras de retención durante su periodo de vigencia, procediendo como se indica en "determinación de cuenta viable total", el número promedio por muestra no es menor al 50 % en relación con cualquier determinación realizada con anterioridad.		
Destrucción. Antes de descartar los indicadores biológicos, esterilizar por vapor durante un tiempo de al menos 30 min a 121 °C o por un método que		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
tenga una letalidad mayor o igual que la de esterilización por vapor. Este método de esterilización se usa para los indicadores utilizados en los procedimientos anteriores.		
PRUEBAS DE RESISTENCIA. En todas las pruebas descritas en esta sección y en la sección de Puroza, trabajar en condiciones asépticas, usando cuando sea necesario material estéril. Evaluar al indicador biológico en una cámara provista de dispositivos que permitan verificar y controles que permitan regular la temperatura, el tiempo y la presión de vapor. El contenido de aire dentro de la cámara es reemplazado completamente por vapor en un máximo de 10 s, hasta alcanzar una temperatura de 121.5 ± 0.5 °C con la correspondiente presión de vapor saturado, cuando la cámara se vacía se alcanza la presión atmosférica en no más de 5 s. El diseño de la cámara es tal que el contenido pueda extraerse en no más de 5 s una vez evacuado el vapor. La cámara se calibra con termopares u otros dispositivos distribuidos adecuadamente para constatar que la temperatura en diferentes puntos tienen una uniformidad de ± 0.5 °C. La presión de vapor saturado es verificable y controlable de manera que el valor elegido sea de 204.8 kPa equivalentes a 1.535 mm de mercurio con una precisión de ± 3.45 kPa (± 25.88 mm de mercurio). Los tiempos especificados se miden con un reloj que registre intervalos de un segundo.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
1. Determinación de los tiempos de sobrevivencia y de muerte: Tomar 200 muestras del indicador biológico en su empaque individual repartidas en números iguales en dos o cuatro recipientes adecuados, distribuirlos en la cámara de esterilización en una posición específica para que estén expuestos a las condiciones de esterilización establecidas. La cámara de esterilización se calibra previamente a su uso con los recipientes pero sin muestras, durante por lo menos 60 min. Para realizar la prueba, precalentar la cámara a la temperatura especificada, mantenerse ésta durante 5 min. Debe enfriarse la cámara y abrirse la puerta lo más pronto posible, una vez abierta la puerta, introducir inmediatamente él o los recipientes con las muestras, esta operación no dura más de 5 s. Aumentar la presión hasta obtener la temperatura deseada y mantener ésta durante el tiempo seleccionado. El periodo de exposición para la determinación de los tiempos de sobrevivencia y de muerte, se selecciona dependiendo de la concentración de esporas, la temperatura y el valor D que se indican en la etiqueta, por ejemplo, para un indicador biológico con una concentración de esporas de 1×10^6 por tira, una temperatura de esterilización de 121 ± 0.5 °C y un valor D de 1.6 min, el tiempo de exposición es de 5 min, transcurriendo éste, la cámara es enfriada lo más rápidamente posible, y el o los recipientes		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
con las 100 muestras se extraen. Para determinar el tiempo de muerte, repetir el procedimiento inmediatamente con las 100 muestras restantes, en caso de ser necesario precalentar la cámara. Para el ejemplo dado, exponer durante 16 min a la temperatura especificada. Terminado el ciclo de prueba y antes de transcurrir 4 h, sembrar las muestras en tubos que contengan 10 mL de caldo de soya-tripticaseína (MGA 0381). Incubar los tubos entre 55 y 60 °C y observarlos diariamente, hasta completar siete días de incubación. La prueba es satisfactoria si todos los tubos sembrados con las muestras expuestas para determinar el tiempo de sobrevivencia muestran crecimiento específico de <i>Bacillus stearothermophilus</i> y si ninguno de los tubos inoculados y con las tiras empleadas para determinar el tiempo de muerte presentan crecimiento.		
2. Determinación del valor D. Proceder como se describe en <i>Determinación de los tiempos de sobrevivencia y de muerte</i> hasta "precalentar la cámara". El tiempo de precalentamiento para este caso es de 5 min antes de realizar la prueba, posteriormente enfriar lo más rápido posible hasta llegar a la presión atmosférica, para introducir inmediatamente el recipiente conteniendo el primer grupo de muestras, esta operación no dura más de 5 s. Operar el aparato		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
para obtener la temperatura deseada. Después de que las muestras han sido expuestas a las condiciones preestablecidas enfriar el equipo lo más rápido posible, extraer el recipiente y reemplazarlo por otro. Repetir el procedimiento con los 9 grupos restantes, exponiendo cada grupo durante diferente tiempo, pero a la misma temperatura. Proceder como se describe en Determinación de valor D para indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco empezando en "para conocer el número" con la diferencia de incubar las placas entre 55 y 60 °C.		
1. Determinación de la cuenta viable total. Tomar 3 muestras del indicador biológico y disgregarlas en un equipo usando 100 mL de agua fría estéril, con el fin de obtener una suspensión homogénea. Tomar 10 mL de la suspensión y depositarlos en un tubo de ensayo estéril, transferir 1 mL a cada uno de dos recipientes estériles adecuados y preparar diluciones seriadas en agua estéril, de tal manera que en una dilución se tengan de 30 a 300 UFC por caja. Sembrar 1 mL de cada dilución en cada una de dos cajas de Petri estériles, adicionar en cada caja aproximadamente 30 mL de medio de agar soya tripticaseína (MGA 0571), el cual se encuentra a una temperatura de 45 a 50 °C. Girar cuidadosamente para tener una suspensión		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
homogénea y dejar solidificar. Incubar las cajas en posición invertida a una temperatura entre 55 y 60 °C y observarlas después de 24 y 48 h. Contar las cajas que tengan entre 30 y 300 UFC, reportar el número de UFC por caja y calcular el número promedio de microorganismos por tira, tomando en cuenta la dilución empleada que no es menor al número especificado en la etiqueta, ni mayor al 300 %.		
PRUEBAS DE PUREZA 1. Presencia de otros microorganismos. Proceder como se describe en Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco. 2. Límite de formas vegetativas. Tomar tres tiras del indicador biológico y tratarlas como se indica en Determinación de cuenta viable total. Depositar dos porciones de 10 mL cada una en tubos con tapón de rosca, calentar una de las porciones en un baño de agua a 100 °C durante 10 min y enfriarla rápidamente en un baño de hielo. Realizar en cada porción una Determinación de cuenta viable total proceder a partir de "tomar 1 mL en cada uno de los dos tubos". El número promedio de microorganismos contenido en la porción calentada, no es menor del 90 % del número correspondiente a la porción no calentada.		



“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
ESTABILIDAD Y DESTRUCCIÓN. Proceder como se describe en Indicadores biológicos en tiras de papel para esterilización por calor seco.		

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

CONSULTA