



ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar

ISSN: 0138-6204

revista@icidca.edu.cu

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar  
Cuba

Pérez, Heidy; Sánchez, Vicente L.

Propuesta de diseño de monitoreo ambiental microbiológico para diagnóstico de niveles de contaminación en áreas de procesamiento aséptico

ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. 44, núm. 3, septiembre-diciembre, 2010, pp. 7-14

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar  
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120684002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Propuesta de diseño de monitoreo ambiental microbiológico para diagnóstico de niveles de contaminación en áreas de procesamiento aséptico

Heidy Pérez<sup>1</sup> y Vicente L. Sánchez<sup>2</sup>

1. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar  
Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba  
heidy.perez@icidca.edu.cu

2. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)  
Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, La Habana 10600, Cuba

## **RESUMEN**

*El monitoreo ambiental está diseñado para demostrar el control de partículas viables y no viables en un área crítica, en este caso solo se hace referencia a las viables. Dentro de estas áreas se incluyen el flujo laminar, los laboratorios y otras áreas limpias. El ensayo de partículas viables se realiza para bacterias, levaduras y hongos. Con el objetivo de mantener las áreas seguras y en las condiciones requeridas, es preciso chequear el ambiente de las mismas mediante el monitoreo de las superficies, del aire y del personal. El método empleado para ejecutar el muestreo de superficie es mediante el uso de placas de contacto tipo Rodac. Para el monitoreo del aire se utiliza el método pasivo o por sedimentación y en el personal se utiliza el método de placa de contacto. Las directivas internacionales existentes, avaladas por organismos y entidades reguladoras, establecen los niveles de acción microbiológica para cada condición de muestreo las cuales dependen también del tipo de área aséptica o limpia que se desee monitorear. En este sentido, se propone un diseño para ejecutar los diferentes tipos de muestreo en el departamento de microbiología, específicamente en las cabinas de flujo laminar, cuarto de siembra y cámara fría.*

**Palabras clave:** *monitoreo ambiental, control microbiológico, calidad ambiental, áreas asépticas.*

## **ABSTRACT**

*Environmental monitoring is intended to show the control of viable and non viable particles in critical areas. In this case only viable ones are referred. Among these areas lami-*

nar flows, laboratories and other clean areas. The assay for viable particles is carried out for bacteria, yeast and fungi. Aiming to keep the areas safe and in proper conditions, it is necessary to verify the whole environment through the monitoring of surfaces, air and personnel. The applied method to carry out surface sampling is through the use of contact Rodac-type plates. For air monitoring the passive or sedimentation method is used and for personnel contact plate methods is applied. International standards are supported by regulatory organisms and entities that set up the microbiological action levels for each sampling purpose (air, surface and personnel), which also depend on the kind of aseptic or clean area that has to be monitored. In such a sense, a design is proposed for different sampling types in microbiology department, especially in laminar flow cabinets, inoculation rooms and cold chamber.

**Key words:** environmental monitoring, microbiology control, environmental quality, aseptic areas.

## INTRODUCCIÓN

En el mundo actual donde el interés de los laboratorios de las diferentes áreas de la microbiología es mantener controladas todas las variables que intervienen en sus procesos, tiene particular importancia el monitoreo microbiológico ambiental (MMA) como una herramienta útil para el control de los laboratorios y el monitoreo de las operaciones que se realizan durante un ensayo. Adicionalmente, por requerimientos de los sistemas de calidad y para lograr el cumplimiento de los requisitos derivados de las buenas prácticas de laboratorio; el monitoreo ambiental microbiológico está vinculado al aseguramiento de la calidad mediante el cual se obtienen evidencias documentadas para demostrar que un proceso conduce a resultados de calidad dentro de las especificaciones predeterminadas.

Existe una estrecha relación entre la calidad y el monitoreo ambiental debido a que la calidad conlleva al control, a la mejora de los resultados de un ensayo, de un producto o de un proceso y el monitoreo ambiental controla el ambiente de las áreas de trabajo para asegurar la calidad.

En tal sentido, el diseño de un monitoreo ambiental microbiológico se lleva a cabo principalmente para conocer bajo qué condiciones microbiológicas se realizan determinadas operaciones que necesitan ser controladas, así como obtener información sobre las condiciones microbiológicas de las áreas y tomar acciones que permitan mantener dichas áreas bajo un estricto control

sobre la calidad ambiental. De esta manera, facilita realizar actividades de procesamiento aséptico con las máximas garantías de seguridad.

El monitoreo microbiológico es un procedimiento que nos permite determinar el contenido microbiano de áreas, superficies, personal, equipo y otros. Un aspecto a considerar, es que el monitoreo ambiental no sólo se requiere para la elaboración de productos estériles, sino también para los productos no estériles.

Mantener un control microbiológico ambiental es indispensable para asegurar la calidad de los productos elaborados y es un índice del estado higiénico del ambiente que rodea a las instalaciones. Se aplica para locales cerrados y limpios donde el número y variedad de microorganismos desarrollados deben ser bajos y pocos. Es importante tener en cuenta, que las estrategias de monitoreo se establezcan de acuerdo al área o superficie a muestrear.

El cumplimiento de directivas tanto nacionales como internacionales existentes se encuentra en manos de un grupo de organismos y entidades regulatorias tales como: el Centro Nacional de Seguridad Biológica (CSB), el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), la Organización Internacional de Estandarización (ISO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), entre otras. Estas directivas establecen los niveles de acción

microbiológica para cada condición de muestreo del aire, la superficie y el personal. Esto depende del tipo de área a monitorear sea aséptica o limpia, así como los controles necesarios a realizar bajo condiciones de estado en reposo o en operación.

Sobre la base de este conocimiento, el trabajo cumple el objetivo de proponer un diseño para realizar el monitoreo ambiental microbiológico en áreas de procesamiento aséptico del departamento de microbiología del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).



**Figura 1.** Ejemplo de área aséptica.

### **Definición de tipos de áreas**

Es imprescindible conocer las características de cada área donde se realicen trabajos de monitoreo, control y evaluación de un ensayo, proceso o producto, así como las condiciones en las que se requieren manipular los mismos para lograr una adecuada calidad. Las áreas que se utilizan para estos fines se relacionan a continuación:

**Área limpia:** Área que cuenta con un control definido del ambiente respecto a la contaminación microbiana o por partículas, con instalaciones construidas y utilizadas de tal manera que se reduzca la introducción, generación y retención de contaminantes dentro del área (1).

**Cuarto limpio:** Diseñado, mantenido y controlado para prevenir contaminación microbiana o por partículas de los productos.

**Área aséptica (figura 1):** Área limpia, diseñada y construida para minimizar la con-

taminación por partículas viables y no viables y mantenerla dentro de límites preestablecidos (2).

**Área crítica:** Área limpia donde el producto, envases primarios y cierres estériles se exponen a condiciones ambientales diseñadas para preservar la esterilidad (2).

En dichas áreas de trabajo debe asegurarse que las condiciones ambientales, bajo las cuales se realizan los ensayos microbiológicos, no invaliden los resultados del ensayo. Otros elementos importantes, son la limpieza, desinfección e higiene de las áreas para eliminar la posibilidad de contaminaciones en todas las etapas del ensayo, proceso o producto.

Es por esto, que uno de los factores a considerar durante la elaboración de un producto es la contaminación proveniente del ambiente donde se está preparando, ya sea producción en gran escala, como se hace en los laboratorios e industrias, o en pequeña escala como ocurre en la oficina de farmacia. Esta contaminación se debe a las partículas presentes en el aire, las cuales pueden provenir del suministro del mismo, del personal y las desprendidas por los equipos y demás superficies del área de trabajo.

Un equipamiento imprescindible dentro de estas áreas lo constituyen las campanas de flujo laminar, las cuales pueden ser verticales u horizontales y deben ser colocadas en ambientes controlados sin corrientes de aire que pueden perturbar el flujo unidireccional. En el ICIDCA, se cuenta con una campana de flujo laminar vertical cuyo filtro HEPA, está colocado en la parte superior de la campana y el flujo de aire se desplaza hacia la parte inferior de la misma donde hay rejillas que permiten su salida. Dicho dispositivo tiene el inconveniente de proteger al producto, pero no al personal ni al medio ambiente.

### **Monitoreo microbiológico ambiental**

El monitoreo ambiental en un laboratorio de microbiología debe evaluar tanto la calidad microbiológica del aire (3) como la de la superficie (4). Es por esta razón, que los niveles de microorganismos en aire y superficies se establecen en base al riesgo

de contaminación del producto o proceso. Para esto es necesario determinar límites de acción, los cuales son definidos como los niveles que al ser excedidos, indican que el proceso se ha desviado de sus condiciones normales de operación. El rebasarlo implica tomar una acción correctiva, para que el proceso regrese a sus condiciones normales de operación.

Existen suficientes indicios de que en áreas de oficinas, laboratorios, almacenaje y servicios generales coexisten sustancias capaces de alterar sus propiedades físico-químicas y proveer las condiciones necesarias para el desarrollo y crecimiento de microorganismos que alteran las propiedades biológicas del aire, lo cual puede originar efectos nocivos sobre la salud de las personas y sobre los materiales, dependiendo de la concentración y permanencia de estas sustancias en el ambiente (5-8).

La cuantificación del riesgo potencial en ambientes de trabajo se basa en la determinación de la exposición y su comparación con los límites establecidos en las normativas vigentes. Para llevar a cabo el monitoreo ambiental, deben establecerse límites de alerta y de acción apropiados. Estos límites deben determinarse teniendo en consideración que el objetivo principal es detectar condiciones que se alejen del comportamiento habitual del ambiente productivo (9).

Basado en lo anterior, es útil determinar los valores de alerta y de acción a partir del comportamiento histórico, tanto para áreas donde se elaboran productos no estériles, donde las normas no establecen límites de referencia, como para aquellas utilizadas en la elaboración de productos estériles, en las cuales los límites establecidos pueden resultar menores a los recomendados por las disposiciones vigentes, permitiendo un mayor control microbiológico del ambiente.

### **Estrategia del monitoreo microbiológico ambiental**

Dentro de los parámetros microbiológicos monitoreados por excelencia se encuentran el aire, las superficies y el personal. En el caso del aire, se realizan conteos de partículas viables (microbiología) mientras que para la superficie y el personal se determina la contaminación microbiana en el equipamiento,

las superficies de trabajo, paredes y pisos.

El programa de monitoreo ambiental es más amplio que el monitoreo microbiológico ambiental, que se trata en este trabajo. Dicho programa incluye monitoreo de rutina para partículas en el aire tales como viables y no viables. En ambientes industriales las partículas viables son generalmente las de más preocupación en el producto estéril, sin embargo, las partículas no viables también deben supervisarse como un indicador fiable de los sistemas de control medio ambientales (10, 11).

### **Monitoreo del aire**

La evaluación de la calidad microbiológica del aire puede realizarse mediante métodos activos y pasivos.

Los métodos activos o volumétricos utilizan dispositivos para tomar un volumen definido de aire y luego determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en él. Un ejemplo de estos dispositivos es el centrifugo de Reuter, el cual tiene una turbina que aspira el aire y hace que las partículas impacten sobre una tira de agar colocada en la pared interna de la turbina. Es un dispositivo portátil y funciona con baterías (12).

Un sinnúmero de investigaciones se han desarrollado en el campo del muestreo microbiológico del aire desde el punto de vista volumétrico, han permitido llegar a importantes conclusiones (13) y a continuación se resumen las siguientes:

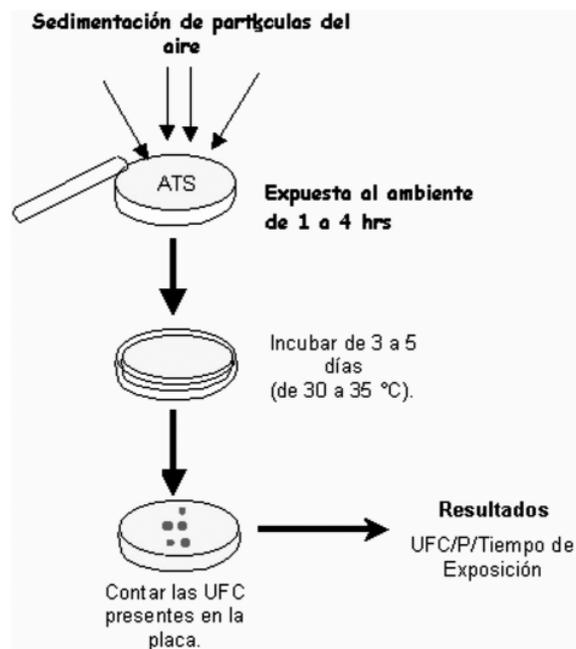
1. La muestra mínima en superficies es de 100-125 cm<sup>2</sup>, a causa de la distribución no homogénea de los microorganismos. En el aire el número de muestreos debe ser la raíz cuadrada del volumen de la sala y el muestreo mínimo y máximo por placa debe ser 200 L.
2. No existe correlación entre los recuentos de superficies y los del aire que las rodea por la aparición de un factor que distorsiona contundentemente los resultados: la carga microbiana de las personas. Por ello, deben realizarse muestreos de aire y también de superficies.
3. A menor caudal de muestreo, menor velocidad de impacto, menor efecto rebote y mayor recuperación de microorganismos.

Tradicionalmente, los muestreos del aeroplancton se venían realizando median-

te el método llamado de sedimentación pasiva, el cual es cualitativo, a lo sumo semicuantitativo y sus resultados se dan en UFC por placa (14).

El otro método más empleado en el monitoreo del aire es el pasivo o por sedimentación en placas de Petri. En este método los microorganismos viables presentes en el aire, son llevados a la superficie del medio sólido por las corrientes de aire presentes en el área. Es un método fácil de realizar y económico que nos permite obtener información sobre los microorganismos capaces de sedimentar en el aire (15).

El aire es monitoreado mediante un método microbiológico pasivo aplicando la técnica de placa expuesta donde ocurre la sedimentación de partículas del aire. Dicha técnica consiste en exponer al ambiente la placa de Petri que contiene el medio Agar Triptona Soya (ATS) en un período de 1 a 4 horas. Pasado este tiempo, se incuba la placa de 3 a 5 días a las temperaturas entre 30 y 35 °C, cuyo resultado indica el conteo de colonias expresado como unidades formadoras de colonias (UFC) por placa por tiempo de exposición. La figura 2 muestra el procedimiento para el método de placa



**Figura 2.** Técnica de placa expuesta empleada en el monitoreo del aire.

expuesta para el monitoreo de contaminación aérea.

Las técnicas actuales para el monitoreo de partículas viables en el aire están limitadas (16) por:

- El equipamiento disponible.
- El tiempo necesario para demostrar la presencia de microorganismos en la muestra del aire tomada.
- La incapacidad para re-probar el ambiente de un modo oportuno para la garantía de los resultados.
- Las dificultades en el monitoreo continuo del ambiente debido a las consideraciones tales como secar fuera de los medios de cultivos.

### Monitoreo de superficies

En la evaluación de la calidad microbiológica de las superficies se emplean el método de hisopado y el de placa de contacto (Rodac) (15).

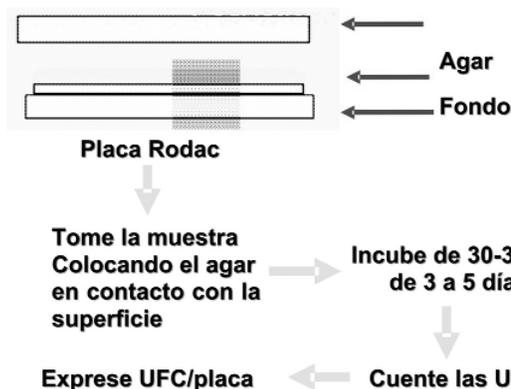
El método de hisopado utiliza un hisopo humedecido, el cual se frota en tres direcciones sobre un área predeterminada, luego se coloca en un diluyente para liberar los microorganismos presentes y de allí se toma una alícuota y se siembra en un medio sólido. Este método se utiliza para superficies irregulares o de difícil acceso.

Por otra parte, el método de la placa de contacto (Rodac) cuenta con placas llenas de un medio nutritivo sólido con una superficie convexa que se presionan sobre la superficie plana a evaluar. Es utilizado para superficies planas. Algunas de las desventajas de este método es que no se utilizan para superficies irregulares, si el medio es humedecido puede ocurrir la concurrencia de microorganismos y el residuo del medio puede ser eliminado del sitio de la muestra (16).

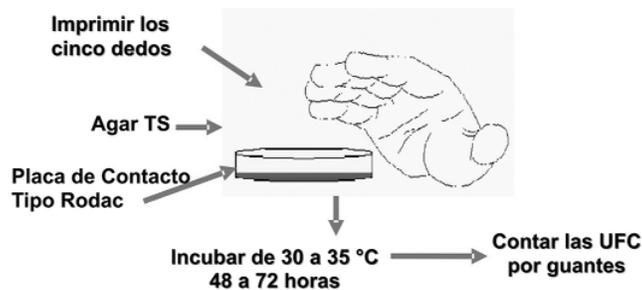
Las superficies son monitoreadas por métodos microbiológicos a través de la técnica por placa de contacto tipo Rodac. El desarrollo de esta técnica comienza a partir de placas Rodac con medio Agar ATS y se hace contactar la superficie con el agar para luego incubar en las condiciones indicadas en la figura 3 y los resultados se expresan como UFC por placa.

### Supervisión del personal

El personal es el principal componente en las actividades de un área y la principal fuente de contaminación. Por lo tanto, el



**Figura 3.** Técnica por placa de contacto tipo Rodac para el monitoreo de superficies.



**Figura 4.** Técnica por placa de contacto tipo Rodac para el monitoreo del personal.

monitoreo del personal constituye un buen indicador de la disciplina tecnológica del mismo y es recomendable realizarlo al final de las operaciones críticas y del proceso.

Dicho personal debe estar adecuadamente entrenado, capacitado y documentado acerca de todos los conocimientos necesarios para trabajar en áreas asépticas donde se aplican técnicas microbiológicas, de buenas prácticas de laboratorio, el uso de los medios de protección, así como la higiene y hábitos personales.

El método microbiológico empleado para el personal es de acuerdo a la técnica de placa de contacto (Rodac) por impresión de manos enguantadas. Dicha técnica tiene como principio los pasos que se muestran en la figura 4, y consiste en la impresión de los cinco dedos de cada mano enguantada. Los resultados se expresan en UFC por guantes.

### Propuesta de diseño de un monitoreo ambiental microbiológico en áreas de procesamiento aséptico del departamento de microbiología del ICIDCA

#### Método pasivo o por sedimentación

Muestreo del aire por la técnica de placa expuesta.

Toma de muestra: Se exponen placas de Petri (o sea se abren las placas) en el área de trabajo y durante el proceso de siembra.

Áreas a monitorear o zonas de toma de la muestra: Cabinas de flujo laminar, cuarto de siembra y cámara fría. Medio de cultivo: Agar Triptona Soya (ATS).

Tiempo de exposición: Durante 2 horas.

Tiempo y temperatura de incubación: Luego de la exposición al aire, las placas se cierran e incuban durante 5 días a 30 °C.

Frecuencia de realización de los controles: Estado de reposo semanal y en estado de operación, el tiempo que dure la misma.

Criterio de conformidad: Bajo flujo laminar se establece que para esta técnica sea < 3 UFC/placa/4h, según lo establecido en el anexo 4 de la regulación No. 16-2000 (2).

#### Muestreo de superficies

Muestreo de superficies por placa de contacto tipo Rodac.

Toma de muestra: Destapar las placas y poner en contacto el agar con el área de la superficie a muestrear en el estado de reposo y al finalizar la operación.

Superficies a monitorear: Superficies interiores de las cabinas de flujo laminar, piso y paredes del cuarto de siembra y de la cámara fría.

Medio de cultivo: Agar Triptona Soya.

Tiempo y temperatura de incubación: Luego del muestreo de las superficies, las placas se cierran e incuban durante 5 días a 30 °C.

Frecuencia de realización de los controles: Estado de reposo semanal y en estado de operación, al finalizar la misma.

Criterio de conformidad: Bajo flujo laminar se establece que para esta técnica sea

< 3 UFC/placa, según lo establecido en el anexo 4 de la regulación No. 16-2000 (2). Las superficies del cuarto de siembra y la cámara fría no son áreas clasificadas.

#### *Muestreo del personal*

Muestreo de manos enguantadas por placa de contacto tipo Rodac.

Toma de muestra: Destapar las placas e imprimir los cinco dedos de cada mano en el agar al finalizar la operación.

Parte a monitorear: Los cinco dedos de cada mano.

Medio de cultivo usado: Agar Triptona Soya.

Tiempo y temperatura de incubación: Luego del muestreo de las manos enguantadas, las placas se cierran e incuban durante 5 días a 30 °C.

Frecuencia de realización de los controles: Al finalizar una operación semanalmente.

Criterio de conformidad: Bajo flujo laminar se establece que para esta técnica sea < 3 UFC/guantes, según lo establecido en el anexo 4 de la regulación No. 16-2000 (2).

### **CONCLUSIONES**

La puesta en práctica del monitoreo microbiológico ambiental es una herramienta que permite caracterizar desde el punto de vista microbiológico en qué condiciones realizamos las diferentes operaciones bajo flujo laminar. La prescripción tanto del grado de contaminación del aire como de la higiene de los equipos y del personal son necesarias para establecer un control de inspección higiénico sanitario y llevar a cabo un programa de limpieza y desinfección. En este sentido, la aplicación del diseño propuesto y sus resultados servirán para controlar y tomar las acciones preventivas y correctivas necesarias para mantener la calidad ambiental.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos. Regulación No. 37-2004. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Ministerio de Salud Pública, República de Cuba, 2004.
2. Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos. Anexo No. 4, Regulación No. 16-2000. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Ministerio de Salud Pública, República de Cuba, 2000.
3. Madigan, M. T.; Martinko, J. M y Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. Prentice Hall Iberia, España. 8ª ed. p.984, 2001.
4. Cuesta, A. Acreditación de laboratorios de Microbiología de los Alimentos. Consultora Internacional de la FAO [fecha de consulta: enero, 2009] <<http://www.rlc.fao.org/es/nutricion/codex/rla3014/pdf/micro.pps#1>>, 2009.
5. Burdon, A.; Kenneth, L. y Williams, R. Microbiología. Primera Edición, México, pp. 127-131, 1974.
6. Cordova, Y. Calidad del aire en ambientes interiores: Contaminantes Biológicos. [Tesis de maestría]. Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Facultad de Ingeniería, Universidad Central de Venezuela, Caracas, pp. 63-70, Junio, 2000.
7. Henry, G. y Heinke, G. Ingeniería Ambiental. 2ª Edición. México, pp. 288-290, 492-509, 1999.
8. García, N.; Araujo, I.; Fernández, M.; Salcedo, W.; Cárdenas, C.; Fernández, J.; *et al.* Calidad microbiológica y fisicoquímica del aire en tres laboratorios de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia. CIEN, 13 (2), Maracaibo, 2005.
9. Díaz, D. A. Límites de alerta y de acción para el monitoreo microbiológico ambiental. [fecha de consulta: enero, 2009] <<http://www.monografias.com/trabajos46/limites-control-ambiental/limites-control-ambiental.shtml>.1997>, 1997.
10. PDA/IES Joint Conference on Cleanroom and Microenvironments. Environmental Monitoring of Viables: Surface testing the program and applications, 1992.
11. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Fundamentals of an environmental monitoring program. 2001, 55 (supplement TR13).
12. Donate, A.; Herrero, M. J.; Ibáñez, M. y Sanchis, J. Muestreo del aire, ¿Con placa de contacto o con placa petri?. Revista Técnicas de Laboratorio, (256), 2000.

13. Proyecto Microkit 1999 para optimizar la sensibilidad de los parámetros del muestreo microbiológico del aire. J. Sanchos Solera. Revista BIO del Colegio Oficial de Biólogos, 2000.
14. Sanchis, J. Los nueve parámetros más críticos en el muestreo biológico del aire. Revista Técnicas de Laboratorio, (278): p. 858-862, 2002.
15. Donate, A.; Herrero, M. J.; Ibáñez, M. y Sanchis, J. Muestreo del aire, ¿Con placa de contacto o con placa petri?. Áreas para la elaboración de medicamentos, cosméticos y alimentos. Revista Técnicas de Laboratorio, (256), 2002.
16. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Fundamentals of an environmental monitoring program. Cap. 4.4 Air Monitoring. 55 (5), (supplement TR13): p. 15-19, 2001.