



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Conteo Bacteriano en Microscopio de  
Contraste de Fases.

152

T E S I S   P R O F E S I O N A L

que para obtener el Título  
de Químico Farmacéutico Biólogo

p r e s e n t a :

IRMA CECILIA HERNANDEZ VAZQUEZ

México, D. F.,

1974



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

CLAS. Tesis  
ADQ. 1974 144  
FECHA  
PROC. M.T. ~~1974~~

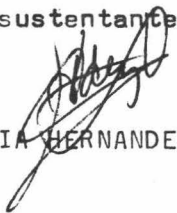


PRESIDENTE: Prof. Julio Terán Zavaleta  
Jurado asignado VOCAL: Prof. Alfredo Echegaray Alemán  
originalmente SECRETARIO: Prof. Jorge Soto Soria  
según el tema 1er. SUPLENTE: Profa. Rosalinda Barrios G.  
2do. SUPLENTE: Profa. Lourdes del Bosque Méndez

Sitio donde se desarrolló el tema:

CIA. MEDICINAL LA CAMPANA S.A. DE C.V.

Nombre completo y firma del sustentante:

  
IRMA CECILIA HERNANDEZ VAZQUEZ

Nombre completo y firma del asesor del tema:

  
PROF. JULIO TERAN ZAVALAETA

A LA MEMORIA DE MI PADRE:  
a quien debo lo que soy

A MI MADRE:  
con respeto y admiración

A FERNANDO:  
con todo mi amor

A MIS HERMANOS:

A MIS AMIGOS:

Y a todos aquéllos que directa o indirectamente han contribuido a la elaboración de esta tesis.

Agradezco a la Cía. Medicinal La Campana los servicios y colaboración que me brindaron para la realización de este trata-  
do.

# I N D I C E

INTRODUCCION	1
DESCRIPCION DEL APARATO	3
PRINCIPIOS DEL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE	8
SITUACION ACTUAL	19
PARTE EXPERIMENTAL	24
RESULTADOS OBTENIDOS	29
ESTERILIDAD	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFIA	77



## INTRODUCCION.-

La presente tesis tiene por objeto realizar un estudio técnico-práctico para obtener una posible solución al problema que el conteo bacteriano crea en las empresas farmacéuticas, debido al tiempo que requiere un producto para análisis (4 días) y, por lo mismo que se retiene en inventarios.

La microscopía es una ciencia que va adquiriendo día a día, mayor importancia. Se sirven de ella las principales ramas de la actividad humana: arte, ciencia, agricultura, industria... El microscopio es el principal elemento en todos los laboratorios de investigación. Es un instrumento indispensable.

Una parte de este trabajo está consagrada al instrumento en sí: historia, funcionamiento y empleo. En capítulos sucesivos pasamos revista a los métodos de conteo bacteriano empleados actualmente, a las posibles aplicaciones del microscopio de contraste de fases en este campo, así como a la forma de preparar los materiales de estudio para ser observados en las mejores condiciones posibles y, desde luego, los resultados arrojados durante el estudio comparativo entre los dos métodos.

Cabe señalar que este trabajo ha sido realizado tra-

tando de ser lo más objetivo, fundamentado e imparcial en la a  
preciación sobre el actual método de conteo bacteriano con el  
fin de lograr una buena comparación con el método del micros--  
copio de contraste de fases.

## MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES.

### DESCRIPCION DEL APARATO.-

El microscopio de contraste de fases revela detalles en especímenes tanto vivos como muertos, fijos, demasiado transparentes como para ser observados en el microscopio ordinario ó normal.

Para lograr el contraste de fases tiene que haber dos tipos de ondas, lo cual se logra con dos haces diferentes:

- a) el haz del objeto
- b) el haz de referencia

El haz del objeto pasa directamente a través del mismo en el microscopio ordinario, pero el otro haz denominado haz de referencia atraviesa la preparación ligeramente a un lado del objeto. A consecuencia de ello los dos haces no atraviesan los mismos materiales. Como la fase de luz que atraviesa cada parte del objeto ha sido alterada en grado diferente en el haz del objeto, y, como la fase de luz en el haz de referencia no ha sido alterada, la amplitud de la luz que sale después está afectada en grados diferentes, según la manera como cada ingrediente tisular ha modificado la fase de las ondas luminosas que los han atravesado (en el haz del objeto), como consecuencia los diversos componentes del objeto aparecerán unos

más claros y otros más oscuros.

Las distintas regiones de la célula difieren en cuanto a índice de refracción que puede considerarse una medida de la velocidad de la luz a través de la materia. El índice de refracción depende en gran parte de la densidad de la región por donde pasa la luz, o sea de la concentración de materia por unidad de volúmen. Mientras mayor sea la densidad, mayor es el índice de refracción y menor la velocidad de la luz. Por lo tanto, la luz que atraviesa el núcleo suele sufrir efectos diferentes de la que pasa por el citoplasma por las distintas concentraciones de las substancias en estos lugares. Las diferencias de trayecto luminoso debidas a factores de este tipo no son fáciles de reconocer en el microscopio ordinario. Los microscopios de contraste de fases son microscopios ópticos modificados para transformar las diferencias de índice de refracción en contraste visible, sea de brillantez, sea de color utilizando el fenómeno conocido como interferencia.

Por ejemplo, en condiciones apropiadas dos ondas luminosas idénticas pueden anularse mutuamente, produciendo obscuridad en lugar de luz cuando llegan juntas a un punto dado. Puede ocurrir así cuando una onda pasa por un medio con cierto índice de refracción y la otra por otro medio con diferente  $n$

dicción de refracción. Aprovechando estos efectos, y aplicándolos a la luz que pasa por la célula en lugar de realizar maniobras sobre la misma se logra una "tinción óptica", de modo que los distintos organelos presentan así un notable contraste con el resto de la célula. Además, por la influencia de la concentración sobre las propiedades ópticas de la materia, los microscopios de contraste de fase también permiten conocer las cantidades de ciertas substancias en distintas células ó en distintas regiones de la misma célula, por ejemplo en fibras musculares en su estado normal comparadas con fibras tratadas con soluciones extractoras.

Ahora bien, las células teñidas y fijadas son visibles porque la tinción absorbe algo de la luz y la luz que emerge de estas células es un poco disminuída en amplitud en comparación con la luz que pasa solamente a través del medio. El ojo es sensible a algunos de los cambios de amplitud los cuales son apreciados como una reducción en la brillantez de la célula y, si, como es usual, algunas longitudes de onda son selectivamente absorbidas, se aprecian solamente como cambios de color. (Figura 1).

La figura 2 es el diagrama del paso de la luz a través de una célula viviente sin fijar, montada en medio acuoso

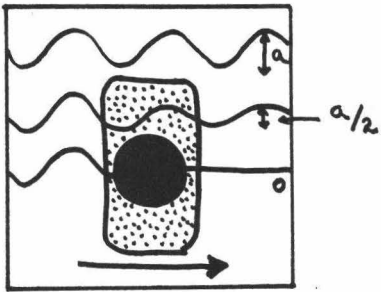


FIG 1

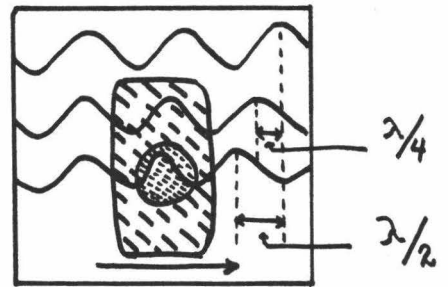


FIG 2

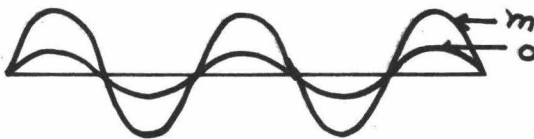


FIG. 3

como solución salina, con un bajo índice de refracción en su propio material y un poco más alto en el citoplasma. Su cualidad radica en las diferencias del índice de refracción entre el contenido de la célula y el medio ambiente que la rodea.

Lo que ha sucedido es que en la entrada de la luz al material celular, la luz es retrasada y las ondas emergentes son consecuentemente desplazadas con respecto a la onda que solamente atravesó el medio de montaje más delgado. Así pues este desplazamiento es llamado un cambio de fase ó en camino óptico y en este caso los cambios de fase en la luz que pasa a través de la célula son retardos en fase.

Esto es teóricamente, desde luego que en la práctica estas condiciones nunca se realizan completamente.

## PRINCIPIOS DEL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE

El microscopio de contraste de fase puso en manos del microscopista una técnica única de valor inmesurable en el exámen del detalle estructural de organismos vivos, transparentes y otros especímenes de propiedades ópticas similares. Tan significativa es su importancia que el Prof. F. Zernicke de Holanda fué premiado con el Premio Nobel en 1953 por su trabajo de pionero en microscopía de fase.

Establecido en términos simples, la función del mi--croscopio de contraste de fase, es la conversión a través de - la manipulación óptica, de las diferencias visibles de inten--sidad de luz.

La Figura 3 es la representación gráfica en un mi- -croscopio ordinario de la luz directa y difractada. La onda m viaja a través del medio de montaje en que se encuentra la cé- lula y la onda o representa la onda que viaja a través de la - célula teñida, esto es ya reducida.

En la figura 4 se muestra un diagrama de la óptica -esencial del microscopio de contraste de fase. El diseño del -microscopio de contraste de fase es esencialmente el mismo que el microscopio ordinario en lo que se refiere al condensador -



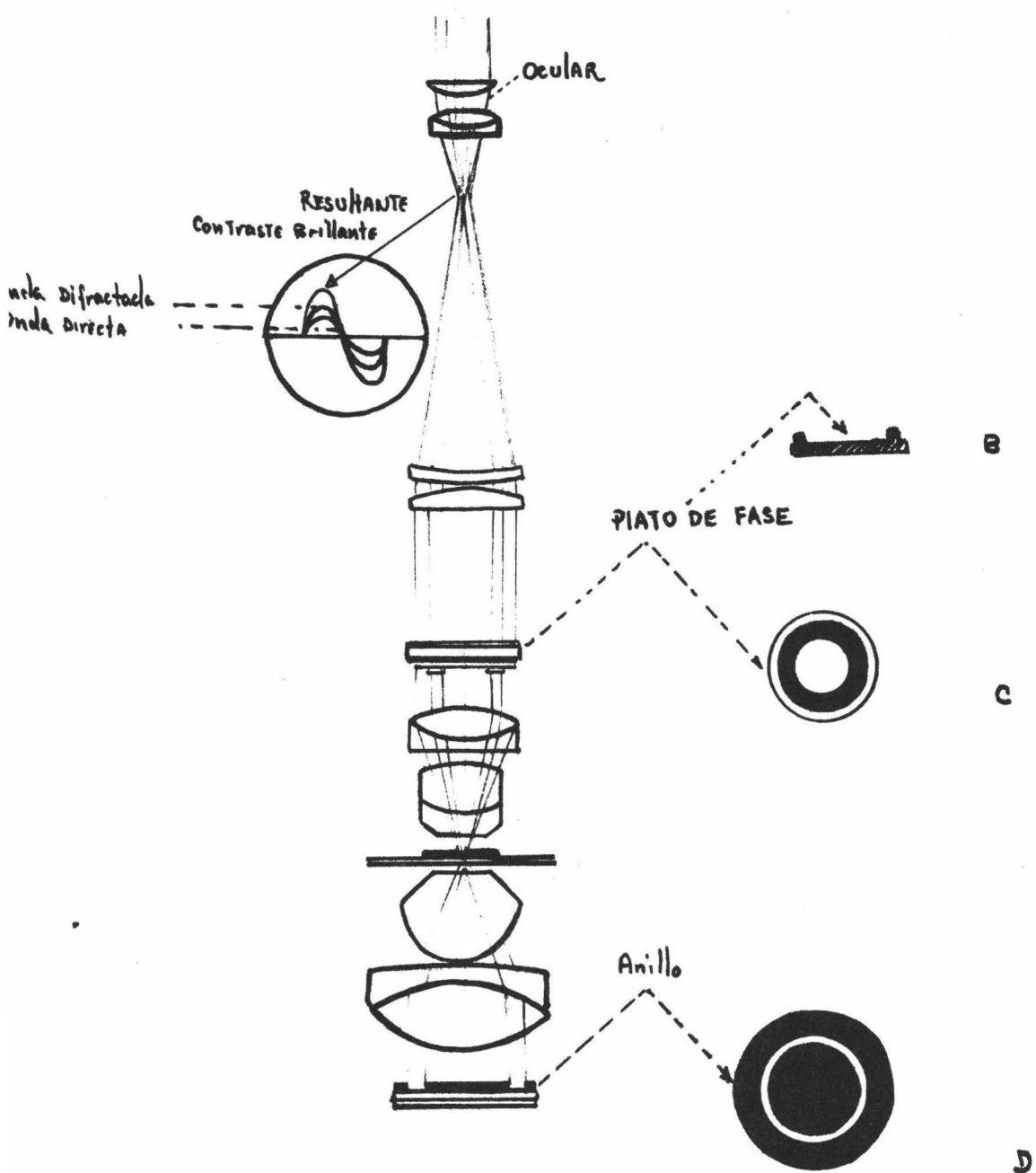


FIG. 4

objetivos y oculares. El microscopio de contraste de fase difiere solamente en que tiene un diafragma especial, normalmente en forma de anillo y precisamente llamado el anillo, en alguna posición entre la fuente de luz y el condensador y, en que tiene una superficie plana de vidrio grabado especialmente con una configuración similar a la del diafragma. Este es llamado plato de fase y es colocado en algún punto sobre las lentes de enfrente del objetivo. Bajo estas circunstancias puede ser apreciado que toda la luz que pasa directamente a través de un objeto colocado en el plano del objeto, como se muestra por las líneas continuas en la figura 4-A pasará solamente a través del área en forma de anillo del plato de fase, el cual se representa en la figura 4-C. Esta área tiene un diferente espesor en relación con el resto del plato de fase.

Así, con la ayuda de el anillo y el plato de fase -- uno llega al estado que se muestra en la figura 5, donde la luz difractada ha sido artificialmente retardada a un cuarto de longitud de onda comparada con la luz directa, las dos fuentes de ondas interfieren con cada cual y en recombinación, forma imágenes con amplitudes variables de objetos que tenían originalmente solo cambios de fase inducidos.

En el microscopio convencional, los detalles del espécimen son casi siempre más oscuros ó más claros que otros, - en la mayoría de los casos, como un resultado del manchado diferencial en el más oscuro de los detalles, la mayor cantidad de luz es absorbida y es como pasa a través del espécimen. De esta manera cada elemento estructural activa, para mayor ó menor grado, como pasa a través la onda de luz. Esta reducción de intensidad resulta una reducción correspondiente en la amplitud de onda de la luz (distancia de la cresta a través de la onda) como muestra la figura 6. La absorción selectiva aquí descrita produce una imagen realmente visible porque el detalle del espécimen aparece como diferencias de brillantez ó de color al cual el ojo es sensitivo.

El espécimen de fase (un pequeño organismo viviente) es transparente, con menos color, es típicamente montado en un medio transparente de propiedades ópticas casi idénticas. -- Porque de la naturaleza transparente del detalle fino sin el espécimen de fase, la amplitud de las ondas de luz pasando a través del espécimen y sus alrededores no se altera apreciablemente. Con muy pequeña ó sin absorción de luz por los elementos estructurales del espécimen, la intensidad de las ondas de luz permanece constante, pues, si faltando la variación de los gra

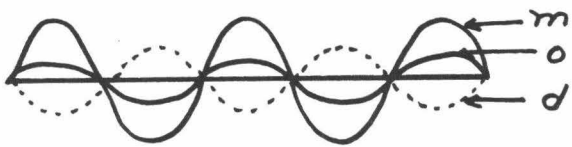


FIG. 5.

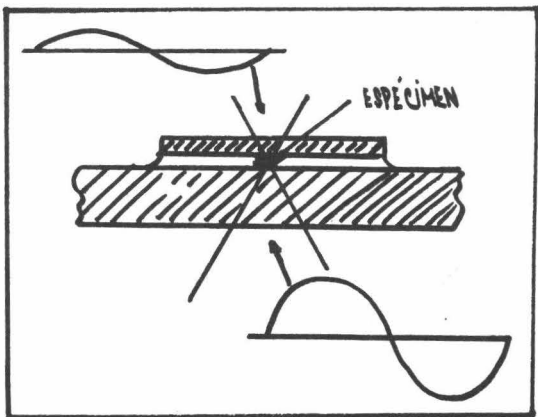


FIG. 6.

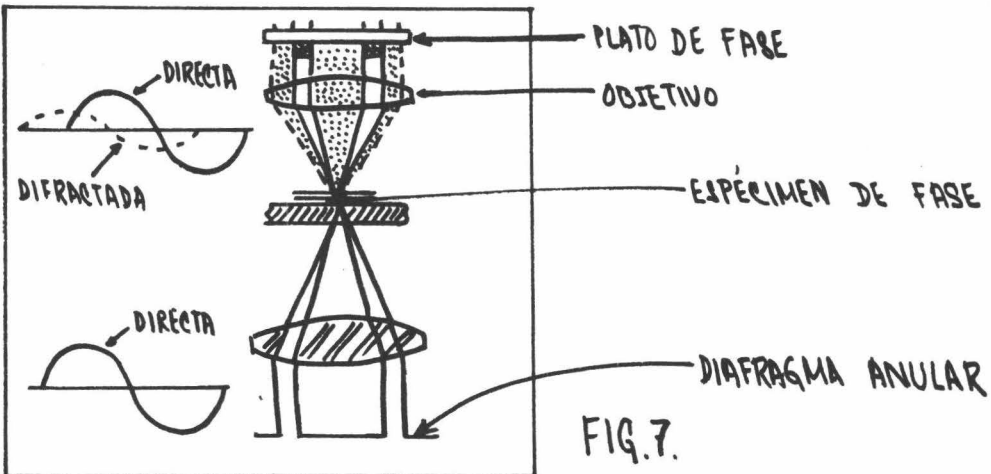


FIG. 7.

dos de la intensidad de luz, una imagen visible al ojo no puede ser formada de la manera clásica.

Así pues, como la luz pasa a través del espécimen de fase, ocurre otro fenómeno muy significativo llamado difracción. Además del detalle estructural fino del espécimen de fase y del espécimen como un todo relativo a sus alrededores, existe lo que se denomina como diferencias en el trayecto óptico, resultante de las diferencias en el índice de refracción y espesor. Las diferencias en el trayecto óptico dan aumento en la difracción por el detalle del espécimen. Las más pronunciadas ó abruptas discontinuidades en el trayecto óptico nos dan el efecto de difracción más grande.

Un resultado de la difracción es el de que la luz es dispersada en comparación a la luz no desviada la cual es transmitida directamente a través de esas áreas del espécimen donde el detalle es insuficiente para causar difracción. La segunda característica importante de la difracción es que ahí está una diferencia de fase entre la luz difractada y la luz no --- desviada ó luz directa. El microscopio de fase hace posible el convertir diferencias en el trayecto óptico al cual el ojo no es sensitivo en diferencia de intensidad ó de amplitud, las cuales el ojo puede observar sin necesidad de usar tinciones.

El microscopio de contraste de fases utiliza dos úni  
cos componentes:

- 1) Un diafragma anular debajo del condensador el cual dirige un cono hueco de luz al espécimen transparente y
- 2) Un objetivo microscópico convencional que es modi  
ficado por la adición de la difracción ó plato de --  
contraste de fase. Este plato es construido y coloca  
do de una manera tal que separa la luz difractada y  
directa proveniente del espécimen y altera su inten-  
sidad y relación de fase, así que se combinan en el  
plano de la imagen visible.

Al mismo tiempo que la luz pasa a través del espéci-  
men de fase y sus alrededores, la difracción ocurre en cada --  
punto donde el detalle estructural interno (de diferente tra--  
yectoria óptica) está presente. Similarmente, la discontinui--  
dad o brusca en la trayectoria óptica al rededor de los bordes  
del espécimen donde éste colinda sus alrededores causan difrac-  
ción. Esta luz difractada es un cuarto de largo de onda fuera  
de fase de luz no difractada por el detalle del espécimen la -  
cual pasa directamente a través del plano del espécimen. Las -  
lentes del objetivo que reciben ambas la luz directa y aquélla

porción de las órdenes difractadas de luz, la cual cae dentro de los límites de la apertura del objetivo (ver figura 7).

Entonces nosotros tenemos esta situación: la luz se mueve del plano del espécimen hacia la difracción ó plato de fase, la luz directa con considerable mayor intensidad que la luz difractada mueve como un cono de luz concentrado hacia -- coincidir con el anillo ó plato de difracción. La luz difractada relativamente débil en intensidad y retardada en fase por un cuarto de largo de onda, se mueve tanto como para ser distribuida sobre la apertura total del plato de difracción.

Así, como la luz directa es más brillante, su intensidad podría tender a perder el equilibrio más débil de la luz difractada y diluir ó destruir el contraste de imagen para -- compensar y traer la luz directa y difractada a un balance, -- se utiliza una película absorbente metálica en forma de un disco -anillo torneado-. Esta película ó cubierta en el anillo -- del plato de fase reduce la intensidad de la luz directa. Así, la absorción tiende a igualar intensidades ó brillantez. Así -- pues, cuando la luz difractada y directa se combinan más tarde en el plato focal del ocular, son balanceadas para llevar a cabo el grado deseado de contraste. Simultáneamente, con el proceso de absorción descrito antes, el plato de difracción rea--

liza una segunda función importante, utilizando un material retardador de fase, la relación de la fase relativa de la luz directa y difractada es alterada por un cuarto de largo de onda. Si el material retardador de fase es colocado encima del disco anillo torneado del plato de difracción resulta una imagen de contraste brillante. En este caso, como muestra la figura 8, la luz directa es retardada por un cuarto de largo de onda, trayéndola dentro de la fase con la luz difractada. De esta manera la luz difractada es reforzada por la superposición agregada de la onda de luz directa. El resultado es una imagen del espécimen la cual aparece más brillante otra vez y más oscuro su contorno (Esto asume que el espécimen tiene características de mayor trayectoria óptica que sus contornos como es generalmente el caso).

Cuando el material retardador de fase es colocado sobre todas las áreas del plato de difracción aparte del disco anillo torneado, resulta una imagen de contraste oscuro. Como muestra la figura 9, la luz difractada es retardada por un cuarto de longitud de onda, el efecto de esta desviación es traer la luz directa y difractada juntas al plano de la imagen de la imagen del ocular un medio de largo de onda fuera de la fase. El resultado es una superposición substractiva de las ondas de



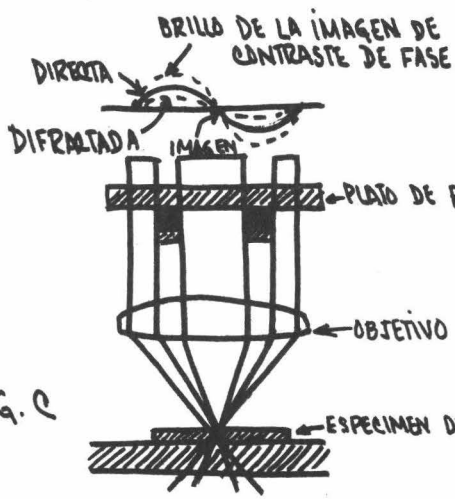


FIG. C

FIG. 8



FIG. D.

FIG 9.

luz por la cual las ondas directa y difractada cancelan cada -  
cual para formar una imagen más oscura que su contorno.

Esta explicación brève y no matemática del microscopio de contraste de fase, junto con la información anterior, nos servirá como guía suficiente para el uso y aplicación del microscopio de contraste de fase en nuestro experimento.

## SITUACION ACTUAL.-

Determinación de la contaminación bacteriológica en diversos productos.

Actualmente y desde hace varios años la determinación de contaminación bacteriológica se lleva a cabo por el método clásico de siembra del producto y conteo del número de colonias desarrolladas.

El procedimiento es como sigue:

Se reciben las muestras, normalmente deben de ser -- dos (2) muestras por lote para que, en caso de contaminación - se rectifique el resultado con la segunda muestra en una segunda resiembra.

De estas dos muestras se toma una para someter a exámen bacteriológico el cual se lleva a cabo en las máximas condiciones de esterilidad.

Dependiendo del producto que se trate se hace una dilución, por ejemplo se toman cuatro mililitros de muestra y se llevan a cien mililitros con agua fosfatada y de esta dilución se coloca un mililitro en cada caja petri estéril, de preferencia deben ser seis cajas, tres para hongos y tres para bacterias. Después se agregan 20 (veinte) mililitros de medio para-

bacterias licuado a una temperatura de 37 a 40 grados centí--- grados a tres de las cajas y, a las tres restantes veinte mili litros de medio para hongos, se mezcla con movimiento rotato--- rio de tal manera que la muestra quede bien dispersa. Se deja solidificar a temperatura ambiente y se someten a incubación - de 37 grados centígrados las tres cajas de bacterias por 24 a 48 horas, mientras que las cajas de hongos se dejan a tempera- tura de 28° C por cuatro días. Inmediatamente después de la in- cubación se procede al conteo de las colonias las cuales, teó- ricamente desarrollan una por cada microorganismo sembrado. Se suma el número de colonias de las tres cajas y se divide entre tres, esto es, se obtiene el promedio el cual se multiplica por 25, debido a la primera dilución efectuada (4:100) y este resu- ltado corresponde al número de bacterias por mililitros de - muestra.

El siguiente paso a efectuar es la identificación de los microorganismos que se puede llevar a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se hace un frotis por tinción de Gram para identi- ficar si se trata de cocos ó de bacilos, Gram positivos ó Gram negativos.

- 2) Se hace una identificación bioquímica, esto es, -

se resiembra en los cuatro medios tradicionales de Sim, Kieglcr Sacarosa-Urea y manitol, los cuales se incuban por 24 horas a 37 grados centígrados y se interpretan de acuerdo con el desarrollo observado, dando un resultado que debe ser comparable únicamente con un solo microorganismo. Así pues los resultados se llevan a una tabla de cualquier libro de Microbiología y se observa con qué microorganismo coincide. En caso de duda se recomienda repetir la bioquímica y dependiendo de los resultados se debe sembrar en medios específicos de desarrollo como por ejemplo: verde brillante para identificación de Salmonella.

a) En algunos laboratorios se evita todo el paso por la bioquímica, utilizando el conocimiento visual de las colonias, esto es, se determina el microorganismo por medio de la observación detallada de la colonia (si es blanca, cremosa, redonda, por decir algo, se puede asegurar que se trata de St. - Albus, lo cual se rectifica por medio del frotis).

b) Además se utiliza mucho un considerable adelanto de los Estados Unidos que se llama Pathotec, el cual consiste en pequeñas tiras de papel impregnadas de diferentes sustancias, las cuales provocan determinada coloración al contacto con determinado microorganismo. Desde luego que ésta es una identificación relativa que unida a la identificación de las -

colonias se puede considerar como suficiente para aceptar ó -  
rechazar un producto.

Como se puede observar en el caso ideal, de que el -  
producto no resulte contaminado, fué necesario perder cinco --  
días, con el producto sin envasar para tener la seguridad de -  
que puede salir a la venta.

Además, ese tiempo es muy significativo en lo que se  
refiere a "tiempo-empleado" y material, esto es, fué necesario:

- a) Lavar cajas y pipetas
- b) Secar cajas y pipetas
- c) Envolver y esterilizar cajas
- d) Preparar y esterilizar agua fosfatada
- e) Esterilizar pipetas
- f) Preparar medios de cultivo y esterilizarlos
- g) Incubar dos y cuatro días. (el producto sembrado)
- h) Hacer frotis e identificaciones y
- i) Reportar

Situación por la cual se ha pensado en disminuir to-  
do esto a, exclusivamente:

- 1) Preparar y esterilizar agua fosfatada
- 2) Hacer una observación directa al microscopio de -

contraste de fases efectuando el conteo e identifica  
ción y

3) Reportar

Todo esto se reduce a menos de dos horas, a diferencia de los cinco días utilizados, independientemente del ahorro muy considerable en: espacio, medios de cultivo, cajas, pipetas, y, sobre todo personal, esto es, "tiempo-empleado" ó sea su ldos ó salarios.

## PARTE EXPERIMENTAL.-

En lo que se refiere a la parte experimental se partió de la base de que el microscopio de contraste de fases, permite la observación directa de los microorganismos vivos.

1) Se procedió al ajuste del factor micrométrico del microscopio con un objetivo micrométrico y un objetivo ocular por medio de los cuales se obtuvo una relación que arrojó los siguientes resultados:

Aumento:

10 X	Factor	=	.010 mm.	=	10 micras
20 X	"	=	.005 mm.	=	5 micras
45 X	"	=	.0022	=	2.2 micras
100 X	"	=	.0001	=	1.0 micras

Esto es, la distancia entre línea y línea, en nuestro microscopio, equivale a 10 micras, 5 micras, 2.2 micras y 1 micra de acuerdo con el aumento utilizado.

2) Identificación morfológica tomando muestras de microorganismos ya identificados por el método clásico y de acuerdo a la descripción microbiológica de los libros, se efectuó la familiarización con cada uno de los microorganismos más



frecuentes en la contaminación de nuestros productos y se micro fotografiaron con el fin de mantener dichas fotografías como - Standard.

3) Se intentó hacer un conteo bacteriano por medio de la cámara cuentaglóbulos, idea que no resultó en virtud de que un glóbulo mide aproximadamente siete micras mientras que una bacteria mide de 0.5 a 1.0 micras, lo cual provocó resultados excesivos, pues una sola bacteria podía ocupar hasta catorce - capas y al contar un plano, en vista de su movimiento se conta ba una bacteria que podía desaparecer y reaparecer, lo cual pro vocaba duplicar el conteo o tal vez triplicarlo.

4) De acuerdo con esta experiencia se investigó otro método.

Obtención del factor microscópico: Se midió el diáme tro del campo microscópico usando objetivo de inmersión por me dio del objetivo micrométrico, se dividió a la mitad para obte ner el radio, con el cual podríamos calcular el área del campo microscópico mediante la fórmula:

$\pi r^2$

Y al delinear un área determinada de 1 cm.<sup>2</sup> en el portaobjetos con lápiz graso podríamos calcular el número de campos en un cm.<sup>2</sup> de la siguiente forma para obtener el factor microscópico:

$$FM = \frac{100}{\text{Area de campo}}$$

5) Determinación del número total de microorganismos en una muestra.

Cuenta microscópica directa.- Este es un método en el cual el número de bacterias en una muestra (caldo de cultivo, suspensión de células, leche, etc.) puede ser determinado por exámen microscópico directo.

Se efectuó tomando 0.01 ml. de muestra en el portaobjetos limitado con lápiz graso y se extendió la muestra uniformemente en el área, se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió a la fijación con dos minutos en xilol y dos minutos en alcohol. No se hizo tinción considerando que la observación sería en contraste de fases.

Entonces se procedió al conteo bacteriano y cálculo de microorganismos por mililitro como sigue:

Se contaron de cuatro a seis campos y se obtuvo el número promedio de microorganismos por campo y este resultado multiplicado por el número de campos nos dice el número de mi-

croorganismos en la muestra que multiplicado por su factor de dilución indica el número de microorganismos por mililitro.

Esto nos llevó a un nuevo problema, nuestro resultado era falso en virtud de que durante el conteo se tomaron en cuenta microorganismos ya fijados, los cuales no podríamos asegurar si se trataba de microorganismos muertos por esterilización ó de microorganismos vivos de contaminación. De aquí que se intentara el conteo en vivo.

6) Conteo en vivo.- Para el efecto hubo de corregirse el factor microscópico pues al colocar el cubreobjetos, la muestra se expandía por capilaridad hasta los extremos, luego entonces se descartó el área de  $1 \text{ cm}^2$  y se consideró un área de  $18 \text{ mm.} \times 18 \text{ mm.}$  lo que modificó considerablemente el factor de la siguiente forma:

$$D = 0.187$$

$$r = 0.0935$$

$$r^2 = 0.00874$$

$$\pi r^2 = 0.0274$$

$$\text{Antes FM} = \frac{100}{.0271} = 3690.03 \text{ en } 1 \text{ cm.}^2$$

$$\text{Después FM} = \frac{324}{.0274} = 11824.81 \text{ en } 324 \text{ mm.}^2 (18 \times 18)$$

De igual manera que en el paso 5o. se procedió al --  
 conteo de campos y el promedio de microorganismos por campo --

multiplicado por el factor de dilución y por el factor microscópico dando como resultado el número de microorganismos por mililitro.

7) Para demostrar la eficacia del método microscópico directo, se corrieron experimentalmente y a la par, durante tres meses, los análisis de las muestras, tanto bacteriológicos clásicamente hablando, como por el método microscópico directo obteniendo los siguientes resultados: (tablas anexas)

## PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05256-33	St. albus	12.98	8.25
05256-44	St. albus	3.5	0.0
05272-1	St. albus	9.44	0.0
05272-2	cocos	1.18	0.0
05272-3	B. subtilis	1.18	0.0
05272-4	B. subtilis	1.18	0.0
05272-5	cocos	3.54	0.0
05272-6	St. albus	10.62	8.25
05272-7	St. albus	3.54	0.0

PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de ino- cación en caj petri
05272-8		0.0	0.0
05272-11	cocos	3.54	0.0
05272-22		0.0	0.0
05381-1	B. subtilis	4.7	0.0
05381-2	B. subtilis	2.3	0.0
05381-3		0.0	0.0
05283-1	B. subtilis	1.18	50.0
05283-2	St. albus	2.3	0.0
05283-3	St. albus	2.3	0.0

## PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05283-4	St. albus	2.3	0.0
05283-5		0.0	0.0
05283-6		0.0	0.0
05283-7		0.0	0.0
05283-8	St. albus	1.18	0.0
05283-11	St. albus	4.7	0.0
05294-1	B. subtilis	8.2	8.3
05294-2	B. subtilis	5.9	0.0
05294-3	B. subtilis	4.7	8.3

## PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de incu- lación en caj petri
05294-4	St. albus	8.26	0.0
05294-5	St. albus	1.18	0.0
05294-6	St. albus	3.54	0.0
05294-7	St. albus	3.54	0.0
05294-44		0.0	0.0
05294-55	St. albus	2.3	0.0
05294-8	St. albus	2.3	0.0
05294-11		0.0	0.0
05294-22		0.0	0.0



PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05294-33	St. albus	2.3	0.0
05292-66	cocos	1.18	0.0
05293-1	cocos (albus)	1.18	16.0
05293-2	St. albus	1.18	8.3
05293-3		0.0	0.0
05293-4		0.0	0.0
05293-5	St. albus	1.18	0.0
05293-6	St. albus	1.18	0.0
05293-7	St. albus	2.3	8.3

## PRODUCTO: MYLAMTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos / ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de incubación en caj petri
05293-8		0.0	0.0
05302-1	B. subtilis	2.3	0.0
05302-2	B. subtilis	0.0	8.3
05302-3	B. subtilis	3.54	0.0
05302-4	B. subtilis	1.18	0.0
05302-5	B. subtilis	1.18	0.0
05302-6	B. subtilis	8.26	8.3
05302-7	B. subtilis	4.7	0.0
05302-8		0.0	0.0

PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoc lación en caja petri
05309-1		0.0	0.0
05309-2		0.0	0.0
05309-3	B. subtilis	1.18	0.0
05309-4		0.0	0.0
05309-5	B. subtilis	1.18	0.0
05309-6	B. subtilis	2.3	0.0
05309-7		0.0	0.0
05309-8		0.0	0.0
05314-1	B. subtilis	1.18	8.25

## PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caj petri
05314-2		0.0	0.0
05314-3	B. subtilis	3.54	0.0
05331-1	B. subtilis, St. albus	3.54	8.25
05331-2	B. subtilis	2.3	0.0
05331-3	B. subtilis	1.18	0.0
05331-4	B. subtilis	4.7	0.0
05331-5	B. subtilis	0.0	8.25
05331-6	B. subtilis	1.18	0.0
05331-7	St. albus, B. subtilis	1.18	8.25

PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caj petri
05331-8	B. subtilis	3.54	0.0
05341-1	B. subtilis	0.0	100.0
05341-1		0.0	0.0
05341-2	B. subtilis	0.0	25.0
05341-2		0.0	0.0
05341-3		0.0	0.0
05341-4		0.0	0.0
05341-5		0.0	0.0
05341-6		0.0	0.0

## PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de in- lación en ca- petri
05341-7		0.0	0.0
05341-8		0.0	0.0
05341-9	B. subtilis	1.18	0.0
05341-10	B. subtilis	1.18	0.0
05350-1	B. subtilis	2.3	0.0
05350-2	B. subtilis	3.54	0.0
05350-3	B. subtilis	3.54	0.0
05350-4		0.0	0.0
05350-5	B. subtilis	3.54	0.0

PRODUCTO: MYLANTA SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05350-6		0.0	0.0
05350-7		0.0	0.0
05350-8		0.0	0.0
05350-9		0.0	0.0

PRODUCTO: GELUSIL SUSPENSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caj petri
05313-1		0.0	0.0
05313-2	B. subtilis	2.3	0.0
05313-3		0.0	0.0
05313-4	B. subtilis	0.0	8.25
05313-5		0.0	0.0
05313-6	B. subtilis	1.18	8.25
05313-7	B. subtilis	1.18	8.25
05313-8	B. subtilis	1.18	0.0
05313-11		0.0	0.0



PRODUCTO: GELUSIL SUSPENSION

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de ino- culación en caja petri
05313-22		0.0	0.0
05313-33		0.0	0.0
05313-44		0.0	0.0
05313-55	B. subtilis	1.18	0.0
05338-1		0.0	0.0
05338-2		0.0	0.0
05338-3		0.0	0.0
05338-4		0.0	0.0
05338-5		0.0	0.0

PRODUCTO: GELUSIL SUSPENSION.

\* PATOGENO.

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de in- lación en ca- petri
05338-6		0.0	0.0
05338-7		0.0	0.0
05338-8		0.0	0.0
05338-11		0.0	0.0
05338-22		0.0	0.0
05338-33		0.0	0.0
05338-44		0.0	0.0
05366-1		0.0	41.50
05366-1		0.0	0.0

## PRODUCTO: GELUSIL SUSPENSION

\* PATCGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05366-2	B. subtilis	0.0	33.25
05366-2		0.0	0.0
05371-1		0.0	0.0
05371-2		0.0	0.0
05371-3		0.0	0.0
05371-4		0.0	0.0
05371-5		0.0	0.0
05371-6		0.0	0.0
05371-7		0.0	0.0

## PRODUCTO: GELUSIL SUSPENSION

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de in- lación en ca- petri
05371-8		0.0	0.0
05371-9		0.0	0.0
05371-10		0.0	0.0
05371-11		0.0	0.0

PRODUCTO: CREMA NATALE HIDRATANTE.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05319-1	Pseudomona*	328.04	Incontables
05319-2	Pseudomona*	430.70	Incontables
05319-3	Pseudomona*	545.16	Incontables
05383-1	St. albus	4.72	0.0
05383-2	St. albus	3.54	0.0
05383-3		0.0	0.0

PRODUCTO: MASCARA FACIAL BU BARRY.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de ir lación en ca petri
05377-1		0.0	0.0
05377-2		0.0	0.0
05377-3		0.0	0.0

PRODUCTO: ENJUAGUE RICHARD HUDNUT.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05374-1		0.0	0.0
05374-2		0.0	0.0
05374-3		0.0	0.0
05375-1		0.0	0.0
05375-2		0.0	0.0
05375-3		0.0	0.0
05376-1		0.0	0.0
05376-2		0.0	0.0
05376-3		0.0	0.0

PRODUCTO: CREMA PARA EL CUERPO PARADOX DU BARRY.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05373-1	B. subtilis	5.90	0.0
05373-2	B. subtilis	9.44	0.0
05373-3	B. subtilis	8.26	0.0



PRODUCTO: SHAMPOO RICHARD HUDNUT.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05360-1		0.0	0.0
05360-2		0.0	0.0
05360-3		0.0	0.0
05363-1		0.0	0.0
05363-2		0.0	0.0
05363-3		0.0	0.0
05363-4		0.0	0.0

PRODUCTO: CREMA TRES FLORES.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en cáj petri
05342-1	B. subtilis	2.3	0.0
05342-2	B. subtilis	5.9	0.0
05342-3	B. subtilis	1.18	0.0
05362-1		0.0	0.0
05362-2	St. albus	1.18	0.0
05362-3	St. albus	1.18	0.0
05361-1		0.0	0.0
05361-2		0.0	0.0
05361-3	B. subtilis	2,3	0.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05231-1	St. albus, B. subtilis	8.2	558.0
05231-1	St. albus, B. subtilis	22.27	25.0
05231-2	St. albus, microbacte- rias, B. subtilis	8.2	233.0
05231-2	St. albus, microbacte- rias, B. subtilis	22.27	25.0
05231-2	St. albus, B. subtilis	48.88	50.0
05231-2	St. albus, B. subtilis	66.34	66.67
05231-3	St. albus, micrococos	8.2	66.0
05231-3	St. albus, micrococos	66.34	66.67
05231-4	St. albus	5.6	8.3

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\*PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05230-2	St. albus, B. subtilis	25.9	41.66
05230-3	St. albus, B. subtilis	33.04	50.0
05230-4	St. albus	31.6	32.25
05273-1	St. albus	15.34	32.25
05273-2	St. albus	47.08	41.50
05273-3	St. albus	17.08	16.50
05273-4	St. albus, B. subtilis	17.08	16.50
05273-5	St. albus, B. subtilis	49.44	50.00
05273-6	St. albus	68.2	66.50

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

## \* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05273-7	St. albus	57.08	58.25
05277-8	St. albus	4.7	0.0
05273-9	St. albus	11.8	16.50
05284-1	St. albus	77.08	75.0
05284-2	St. albus	58.26	58.00
05282-111	St. albus, B. subtilis	36.58	50.0
05282-222	B. subtilis	67.14	66.50
05282-333	B. subtilis	129.5	125.0
05282-444	B. subtilis	51.92	50.0

PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05284-11	B. subtilis	16.52	50.0
05292-1	B. subtilis	118.88	108.25
05292-2	St. albus, B. subtilis	88.26	83.25
05292-3	St. albus, B. subtilis	20.06	58.0
05292-4	St. albus, B. subtilis	89.44	83.0
05292-5	St. albus, B. subtilis	16.52	32.0
05292-8	St. albus, B. subtilis	11.8	25.0
05292-11	St. albus	15.34	25.0
05292-12	St. albus	14.16	32.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05292-13	St. albus	22.42	50.0
05297-3	St. albus, B. subtilis	25.96	25.0
05297-4	B. subtilis	22.42	25.0
05297-5	B. subtilis	15.34	16.5
05297-6	St. albus, B. subtilis	18.8	16.5
05297-7	B. subtilis	10.62	16.5
05304-1	St. albus, B. subtilis	84.96	75.0
05304-2	St. albus, B. subtilis	97.94	58.0
05304-3	B. subtilis	96.76	100.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05304-4	B. subtilis	75.52	58.0
05304-6	B. subtilis	33.72	33.25
05304-7	B. subtilis	61.36	83.25
05304-8	B. subtilis	42.48	33.25
05304-22	St. albus, B. subtilis	40.12	41.5
05304-33	B. subtilis	42.48	50.0
05305-11	B. subtilis	81.42	66.5
05305-55	B. subtilis	55.46	83.25
05306-1	B. subtilis	49.56	50.0



## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05306-2	B. subtilis	53.10	66.0
05306-3	B. subtilis	63.72	58.0
05306-4	B. subtilis	53.10	58.0
05312-1	B. subtilis	5.9	8.25
05312-2	B. subtilis	35.3	33.25
05312-3	B. subtilis	12.3	16.50
05312-8	B. subtilis	13.54	16.50
05312-9	B. subtilis	77.08	66.50
05312-10	B. subtilis	55.9	50.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05312-11	B. subtilis	74.7	75.0
05312-12	B. subtilis	33.5	33.25
05312-13	B. subtilis	19.44	25.0
05312-14	B. subtilis	41.18	41.50
05306-5	B. subtilis, St. albus	70.80	83.25
05306-8	St. albus	44.84	50.0
05306-9	B. subtilis	14.16	25.0
05315-1	St. albus, B. subtilis	142.78	166.50
05315-3	St. albus, B. subtilis	188.80	166.50

PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05315-8	St. albus, B. anitratum	105.88	108.25
05315-55	B. subtilis	200.60	116.50
05315-66	B. subtilis	85.26	66.50
05315-77	B. subtilis	129.36	125.0
05328-1	St. albus, B. subtilis	10.62	16.50
05328-3	B. subtilis	75.34	75.0
05328-3	B. subtilis	168.26	175.0
05328-4	B. subtilis	99.44	66.50
05328-5	B. subtilis	125.9	125.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05328-6	B. subtilis	9.44	8.25
05328-7	B. subtilis	55.9	58.25
05330-1	B. subtilis	152.22	175.0
05330-2	B. subtilis	174.64	166.50
05330-3	St. albus, B. subtilis	171.10	168.25
05327-7	B. subtilis	217.31	200.00
05351-4	B. subtilis	93.22	83.25
05351-5	B. subtilis	100.30	125.0
05351-6	B. subtilis	92.04	100.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu- lación en caja petri
05351-7	B. subtilis, St. albus	84.96	100.0
05351-11	B. subtilis	102.66	91.50
05351-22	B. subtilis	106.90	141.50
05351-33	B. subtilis	132.16	125.0
05351-55	B. subtilis	109.74	125.0
05351-66	B. subtilis	114.46	150.0
05359-1	B. subtilis	60.54	58.25
05359-4	B. subtilis	81.42	75.0
05359-5	B. subtilis	57.82	75.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoc. lación en caja petri
05359-7	B. subtilis	55.46	66.5
05359-11	B. subtilis	74.34	75.0
05359-22	B. subtilis	62.34	66.5
05359-33	B. subtilis	67.26	100.0
05367-1	St. albus	23.54	25.0
05367-2	St. albus	13.54	16.5
05367-3	St. albus	31.18	33.25
05367-5	St. albus, B. subtilis	44.72	41.50
05367-6	St. albus	21.18	25.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inocu lación en caja petri
05367-7	St. albus	41.18	41.50
05367-8	St. albus	42.36	41.50
05267-9	St. albus	53.54	58.25
05367-10	St. albus	24.72	25.0
05367-11	St. albus	100.0	108.25
05367-13	St. albus, B. subtilis	53.54	58.25
05367-14	St. albus, B. subtilis	32.36	33.25
05367-15	B. subtilis	0.0	8.25
05367-16	St. albus, B. subtilis	0.0	25.0

## PRODUCTO: AGAROL EMULSION.

\* PATOGENO

Muestra	Identificación	Total de microorganismos/ml.	
		Método del Microscopio de contraste	Método de inoculación en caja petri
05367-17	St. albus, B. subtilis	33.54	33.25
05367-18	St. albus, B. subtilis	32.36	33.25
05367-19	St. albus, B. subtilis	104.72	100.0
05367-20	St. albus, B. subtilis	15.90	16.50
05379-1	St. albus, B. subtilis, B. anitratum	193.52	191.50
05379-3	St. albus, B. subtilis, B. anitratum	165.20	158.25
05379-6	St. albus, B. subtilis	107.38	116.50
05379-11	St. albus, B. subtilis	115.64	116.50
05380-1	B. subtilis	94.40	100.0



## ESTERILIDAD.-

Otra aplicación importante es en lo que se refiere a esterilidad, análisis que se efectúa por medio del método millipore a diferentes productos, especialmente (en nuestro caso) inyectables.

El método millipore se fundamenta en una filtración con una membrana de ésteres de celulosa pura y biológicamente inerte la cual permite el paso de los fluidos pero detiene en su superficie a los microorganismos, pues sus poros tienen un diámetro de 0.45 de micra, mientras que las bacterias miden de 0.5 micra en adelante.

Este método es aplicable a todos los inyectables, con la desventaja de que después de filtrado se incuba por siete días con el fin de dar un resultado de negativo ó contaminado.

El método es como sigue:

a) Se reciben las muestras, que en el caso de inyectables son de veinte a treinta muestras las cuales se sumergen en fenol, alcohol, etc. con el fin de evitar la contaminación exterior.

b) El equipo millipore se debe encontrar perfectamente estéril y dentro de un área estéril (con luz UV, campana de

flujo laminar, mecheros, etc.)

c) Se toma una muestra representativa de cada ampolla ó frasco ampula, ya sea con jeringa ó bien recuperando con agua estéril según lo requiera el caso y se coloca la muestra en la copa de filtración que debe estar conectada a una llave de vacío, procediendo a filtrarla.

d) Se procede al lavado con caldo peptonado tres veces consecutivas con el fin de eliminar antibióticos, preservativos, etc. y se corre un testigo al mismo tiempo.

e) Se saca cuidadosamente la membrana y se corta en dos partes, una de las cuales se siembra en medio de hongos -- (caldo de tripticasa soya) y otra parte en medio fluido para bacterias (tioglicolato).

f) El medio de bacterias se incuba a 37 grados centígrados por espacio de siete días.

g) El medio de hongos se incuba a 28 grados centígrados durante siete días.

h) Diariamente se observan los medios de cultivo con el fin de apreciar la contaminación por turbidez.

i) En caso de contaminación se repite el proceso hasta tres veces antes de rechazar un producto.

j) En caso de que un producto se encuentre estéril se aprueba de inmediato.

Como podemos observar este proceso es sumamente seguro, pero también sumamente largo por lo que apreciamos la conveniencia de aplicar el microscopio de contraste de fase para probar la esterilidad en los productos obteniendo los siguientes resultados:

PRODUCTO	LOTE	METODO DEL MICROSCOPICO DE CONTRASTE	MILLIPORE	
			1a. PRUEBA	2da. PRUEBA
PITUITRINA	2	ESTERIL	ESTERIL	
	2A	ESTERIL	CONTAMINADO	ESTERIL
	2B	ESTERIL	ESTERIL	
AMBODRYL	3	ESTERIL	ESTERIL	
SUCCINATO DE CHLORAMYCETIN DE 1 g.	9	ESTERIL	ESTERIL	
	12	ESTERIL	ESTERIL	
	10	ESTERIL	ESTERIL	
	13A	ESTERIL	CONTAMINADO	ESTERIL
	13B	ESTERIL	CONTAMINADO	ESTERIL
	13A	ESTERIL	ESTERIL	
	13B	ESTERIL	ESTERIL	
	11A	ESTERIL	ESTERIL	
	11B	ESTERIL	ESTERIL	
	12A	ESTERIL	ESTERIL	
	12B	ESTERIL	ESTERIL	
	14A	ESTERIL	ESTERIL	
	14B	ESTERIL	CONTAMINADO	ESTERIL
	16A	ESTERIL	ESTERIL	
16B	ESTERIL	ESTERIL		

PRODUCTO	LOTE	METODO DEL MICROSCOPIO DE CONTRASTE	MILLIPORE	
			1a. PRUEBA	2da. PRUEBA
SUCCINATO DE CHLOROMYCETIN DE 250 mg.	7	ESTERIL	CONTAMINADO	ESTERIL
CHLOROMYCETIN INTRAMUSCULAR	3	ESTERIL	ESTERIL	
	4	ESTERIL	CONTAMINADO	ESTERIL
BENADRYL	4	ESTERIL	ESTERIL	
KETALAR	2	ESTERIL	ESTERIL	
	7	ESTERIL	ESTERIL	
AGUA	3	ESTERIL	ESTERIL	
SOLVENTE PA- RA EPAMIN	2	ESTERIL	ESTERIL	

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.-

Haciendo referencia a los resultados obtenidos durante los meses de experimentación podemos apreciar que el presente sistema tiene:

A) Limitaciones

B) Alcances

A) Limitaciones.- En este inciso cabe señalar que se presentaron dos problemas fundamentales:

1) El caso de un jarabe glucosado el cual resultó estéril por el método del microscopio de contraste de fase, mientras que, por el método bacteriológico apareció como contaminado con colonias incontables de *Pseudomonas* (microorganismo patógeno). Se corrieron un sin número de experiencias en diferentes condiciones, arrojando siempre los mismos resultados. Lo único que se puede concluir aquí es el hecho de que las moléculas del jarabe glucosado tengan un índice de difracción tal que logre enmascarar a los microorganismos al combinarse con el índice de difracción del aceite de inmersión. De cualquier manera ésta es una muestra de que el método no es infalible, esto es, como toda regla presenta sus excepciones.

2) El problema del Agarol.- En el caso de este pro--

ducto, como se puede observar en las tablas de resultados, los datos de bacteriología no coinciden tan exactamente, como en los otros productos, con los datos del microscopio. Esto se debe a que el Agarol es un aceite mineral el cual no se puede diluir con agua fosfatada, pues al hacer las observaciones en el microscopio era muy factible confundir a los microorganismos con pequeñas gotas de aceite, además de que la preparación tenía mucho movimiento por lo anteriormente mencionado, sin embargo consideramos que los resultados son bastante aceptables.

B) Alcances: En este inciso tenemos un sin número de buenos resultados, entre los cuales mencionaremos los principales:

1) El primer factor a considerar es el tiempo. Como se ha demostrado con el método bacteriológico se ocupa un mínimo de cuatro días para llevar a cabo el análisis, mientras que, con nuestro microscopio de contraste de fase este tiempo se reduce a un máximo de dos horas el cual es reducible a su vez (con un poco de organización) a diez ó quince minutos, esto implica un gran ahorro económico en lo que se refiere a personal, equipo e inventarios.

2) Es muy importante hacer notar que el método bacteriológico es aceptado en virtud de que no existiera otro, es

to es, como ahora lo sabemos tiene sus fallas, las cuales quedan anuladas con el microscopio de contraste de fase:

a) En el método bacteriológico se hace el conteo de microorganismos de tal manera que arroja resultados de 8, 16, 25, etc. microorganismos por mililitro, lo cual implica que -- nunca habrá un resultado de 2, 3, 4, 5, 6, 6 7 microorganismos por mililitro. Esto es, el microscopio de contraste de fase -- puede dar un resultado abarcando todos y cada uno de los números reales, mientras que en el método bacteriológico , sólo -- pueden dar como resultado múltiplos de ocho. Desde luego que esta diferencia es muy relativa hablando de grandes cantidades pero cuando se trata de un resultado entre cero y ocho microorganismos por mililitro puede pasar como absolutamente estéril mientras que el microscopio puede detectar 0, 1, 2,.....7 microorganismos por mililitro patógenos y, entonces quedar rechazado el producto. Desgraciadamente para nuestro experimento y afortunadamente para la Compañía, no se presentó este caso en cuatro meses de experimentación.

b) Otro punto muy importante que es conveniente aclarar es el hecho de que el método bacteriológico presenta errores de manipulación como se demuestra en el lote 05231 partidas 1,2 y 3, los cuales resultaron rechazados por contaminación (558 mo/ml., 233 mo/ml. y 66 mo/ml. respectivamente) con-



siderando que cualquier producto con más de 500 mo/ml. (no patógenos) está contaminado. Bien, el microscopio de contraste de fase aprobó este lote como estéril.

Se repitió el análisis por ambos métodos, arrojando los siguientes resultados:

	Método del Microscopio	Método de Bacteriología
05231-1	22.27 mo/ml.	25 mo/ml.
05231-2	48.88 mo/ml.	50 mo/ml.
05231-3	66.34 mo/ml.	66.67 mo/ml.

Lo único que se puede concluir en este caso es que - en el método bacteriológico pueden presentarse contaminaciones ajenas al producto por exclusivamente, mala manipulación, esto es, cualquier descuido al sembrar (una puerta abierta, una bata sucia ó bien hablar al trabajar) puede contaminar la muestra y arrojar datos absolutamente falsos.

#### Recomendaciones.-

1) Familiarización con el equipo.- Es absolutamente necesario conocer bien el equipo. Es de primordial importancia manejar el aparato con preparaciones fijas a fin de familiarizarse con él y observar las diferencias que existen con el microscopio ordinario, tanto en seco débil, como en seco fuerte, así como en inmersión.

2) Identificación bioquímica de las cepas.- Dentro de

nuestros productos tenemos una serie de microorganismos frecuentemente contaminantes los cuales se encuentran someramente identificados. Es necesario aislar cada uno de estos microorganismos y sembrarlos en medios selectivos, ya aislados, es indispensable hacer varios juegos de bioquímicas (Sim, Kieglar, Manitol y Sacarosa-Urea) por cada uno de los microorganismos aislados con el objeto de hacer una verdadera identificación, después, hacer frotis para observar si se trata de bacilos ó de cocos, Gram positivos ó Gram negativos y así completar la identificación por el método tradicional. Es muy importante elaborar esta identificación con mucho cuidado en virtud de tratarse de la base de la cual partiremos para montar las técnicas del microscopio de contraste de fases.

3) Identificación microscópica de las cepas.- Ya identificadas todas y cada una de las cepas se procederá a observarlas cuidadosamente en el microscopio con el fin de familiarizarse con las mismas. De aquí depende en gran parte el éxito ó el fracaso de la técnica.

4) El siguiente paso a seguir es el de fotografiar todas y cada una de las cepas observadas en el microscopio y que previamente han sido identificadas. Esto se hace con el fin de establecer standards de referencia, esto es debemos te-

ner una fotografía por cara uno de los microorganismos y sus variantes.

5) Después es necesario proceder a la familiarización con los productos libres de contaminación, es decir, los productos estériles presentan una serie de variantes, pues, lógicamente tienen diferentes ingredientes y se observan por consiguiente diferentes tipos de cristalización y en ocasiones se observarán partículas con apariencia de microorganismos los -- cuales fácilmente se diferencian de éstos por el simple movi-- miento que presentan, es decir, todas las preparaciones deben de ser sumamente diluidas (4:100) pues nosotros apreciamos ~~la~~ transparencia y por lo mismo al observar en el microscopio veremos un movimiento de las partículas (natural) dentro de los líquidos (mov. Browniano) mientras que los microorganismos independientemente de este movimiento presentan un movimiento extra característico de los seres vivos.

6) Es necesario inocular los productos con cada uno de los microorganismos con el fin de identificar éstos últimos con las diferentes variantes que puedan presentar, así, si un producto es mucho más viscoso, ó bien mucho más nutritivo que otro, el mismo microorganismo se puede observar ya sea mucho más alargado, más redondeado, más grande ó más chico etc. Lo -

único importante es identificarlo dentro del producto.

7) Por último se procede al conteo bacteriano e identificación de microorganismos. Este último paso se lleva a cabo considerando el factor de dilución, el factor microscópico y el número promedio de microorganismos por campo. Se ha demostrado con la práctica que las diluciones en agua fosfatada estéril vienen a ser de gran utilidad en la mayoría de los productos, sin embargo, es necesario hacer un estudio respecto a los productos que no se pueden diluir en agua fosfatada, como por ejemplo el caso de los maquillajes y las cremas sólidas y, en general los productos que no son solubles en agua, sin pensar ni remotamente en solventes orgánicos, los cuales matarían inmediatamente a los microorganismos ó por lo menos los inmovilizarían entorpeciendo nuestro conteo, pues los microorganismos que intervienen en nuestro experimento son únicamente los vivos que fácilmente se diferencian por presentar un movimiento pulsátil especial en el microscopio de contraste de fases.

## B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Allen, R.D., Brault, J. y Zeh, R. (1966). "Recent Advances in Optical and Electron Microscopy" 1a. Ed. Barer, R. and-Coslett, V. Academic Press, Nueva York y Londres.
- 2.- Baker, J.R. (1958): "Principles of Biological Microtechnique" 1a. Ed. John Wiley & Sons, Nueva York, E.U.A.
- 3.- Bennett, A.H., Jupnik, H., Osterberg, H. y Richards, O.W.- (1951). "Phase Microscopy Principles and Applications" 1a. Ed. John Wiley & Sons, Nueva York y Londres.
- 4.- Bernis, M., (1972). "Atlas de Microscopía" 4a. Ed. Ediciones Jover, S.A., Madrid, España.
- 5.- Branson, D. (1972) "Microbiología para el Pequeño Laboratorio" 1a. Ed. Charles C. Thomas, Illinois, E.U.A.
- 6.- David, G.B. (1963). "Information" 1a. Ed. Carl Zeiss, Oberkochen y E.U.A.
- 7.- Francon, M. (1961). "Progress in Microscopy" 1a. Ed. Pergamon Press, Oxford, Londres, Nueva York y París.
- 8.- Galigher, A.E. y Kozloff, E.N. (1971). "Essential of Practical Microtechniques" 2a. Ed. Henry Kimpton, Gran Bretaña

- 9.- Grey, P., (1964). "Handbook of Basic Microtechnique" 3a. - Ed. McGraw-Hill, Nueva York, E.U.A.
- 10.- Grimstone, A.V., (1968). "The Electron Microscope in Biology" 1a. Ed. St. Martin's, Nueva York, E.U.A.
- 11.- Ham, A.W., (1970). "Tratado de Histología" 6a. Ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., México.
- 12.- Haro, V. (1972) "Atlas de Biología" 6a. Ed. Ediciones Jover, S.A., Madrid, España.
- 13.- Healey, P., (1971). "Microscopios y Vida Microscópica" 1a. Ed. Editorial Bruguera, S.A., México.
- 14.- Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A., (1973). "Manual de Microbiología Médica" 5a. Ed. El Manual Moderno, S.A., México.
- 15.- Kennedy, D.F., (1965). "The living Cell" 1a. Ed. Freeman, San Francisco, Calif.
- 16.- McClung's, (1950). "Handbook of Microscopical Techniques" 3a. Ed. Hoeber, Nueva York, E.U.A.
- 17.- Meek, G.A., (1970). "Practical Phase Contrast Microscopy for Biologists" 1a. Ed. The University, Sheffield, Inglaterra.

- 18.- Mercer, E.H. y Birbeck M.S.C., (1972). " Electron Microscope" 3a. Ed. Publicaciones Científicas Black Well, Londres.
- 19.- Novikoff, A.B., Holtzman, E., (1970). " Estructura y Dinámica Celular" 1a. Ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México.
- 20.- Richards, O.W., (1963). " Baker Interference Microscope - Reference Manual" 2a. Ed. American Optical Company, Buffalo, Nueva York, E.U.A.
- 21.- Ross, K.F.A., (1967). "Phase Contrast and Interference -- Microscopy for Cell Biologists" 1a. Ed. St. Martin's Press Nueva York, E.U.A.
- 22.- Spratt, M.T., (1969). "Introducción a la diferenciación Celular" 1a. Ed. Editorial Alhambra, S.A., Madrid, España
- 23.- Zernike, F., (1964). "Achievements in Optics" 4a. Ed. Bowers, A. Elsevier, Nueva York, E.U.A.

