

49  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**“ EVALUACION DE LA CONTAMINACION  
AMBIENTAL MICROBIANA EN AREAS  
PARA LA PRODUCCION DE FORMAS  
FARMACEUTICAS NO ESTERILES ”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A**  
**SILVIA GUTIERREZ ORTIZ**



**MEXICO, D. F.**

**1995**

**FALLA DE ORIGEN**  
**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

**JURADO ASIGNADO:**

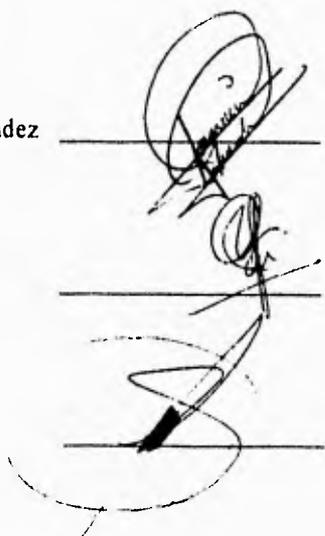
**PRESIDENTE: ETELVINA MEDRANO BARRA**  
**VOCAL: JOSE LUIS IBARMEA AVILA**  
**SECRETARIO: PEDRO ALFREDO GORGONIO HERNANDEZ**  
**1er. SUPLENTE: BEATRIZ LUNA MILLAN**  
**2do. SUPLENTE: AIDA NAVAS PEREZ**

Sitio donde se desarrolló el tema: **Laboratorios Syntex, S.A. de C.V.**  
Cerrada de Bezares N° 9  
Col. Lomas de Bezares C. P. 11910  
Delegación: Miguel Hidalgo  
México, D. F.

Asesor del tema:  
Q.F.B. Pedro Alfredo Gorgonio Hernández

Asesor técnico:  
Q.B.P. Sergio Alberto García Yúdico

Sustentante:  
Silvia Gutiérrez Ortiz



## **AGRADECIMIENTOS**

- \* A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química; y a los Laboratorios Syntex, S.A. de C.V., por la oportunidad que me brindaron para iniciar mi desarrollo profesional.
- \* A mi Jefe y compañeros de trabajo; Homero Flores, Daniel García, Joaquín Alanís y José Antonio Raya, por su ayuda profesional.
- \* Al Q.B.P. Sergio Alberto García Yúdico, que además de ser mi asesor técnico, me distingue con su amistad.
- \* Muy especialmente, al Q.F.B. Pedro Alfredo Gorgonio Hernández, asesor del tema, por su disposición y ayuda invaluable, para él mi reconocimiento y lealtad incondicional.
- \* A mi papá y demás familiares y amigos por su cariño y apoyo de siempre.
- \* A todas aquellas personas que con su ayuda hicieron posible la realización de este trabajo.

- Este trabajo está dedicado al ser humano más maravilloso que he conocido y que me ha dado todo.

Gracias **mamá.**

## CONTENIDO

SECCION	PAGINA
<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>GENERALIDADES</b>	4
2.1 Contaminación de productos farmacéuticos.	4
2.2 Fuentes de contaminación microbiana en productos farmacéuticos.	4
2.3 Factores que afectan la supervivencia y crecimiento de organismos en productos farmacéuticos.	12
2.4 Riesgos de infección.	14
2.5 Condiciones ambientales.	18
2.6 Sistema API.	25
<b>PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS</b>	27
<b>DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	54
<b>ANEXOS</b>	56
Anexo N° 1 Método de muestreo	56
Anexo N° 2 Método de identificación	58
Anexo N° 3 Promoción de crecimiento	69
Anexo N° 4 Cálculos	71
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	73

## **INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

En 1972, en Inglaterra, se detectó la presencia de *Salmonella shwarzengrund* y *Salmonella eimsbuttel* en un lote de pancreatina, medicamento usado por niños con fibrosis quística; el medicamento, lejos de aliviarlos les causó infecciones gastrointestinales agudas. El lote se recogió del mercado (Recall).

Otro caso se dió, cuando se aisló *Pseudomonas multivorans* de heridas infectadas de pacientes que cursaban procesos post-quirúrgicos. El origen de la infección, fue un desinfectante diluido de clorhexidina-cetrimida que contenía  $10^6$  UFC/mL.

Además de estos ejemplos, podrían citarse muchos otros (22).

Para lograr que un medicamento cumpla con una especificación microbiológica, no es suficiente el control como producto terminado, es necesario controlar los diferentes factores a lo largo del proceso de fabricación: calidad de materias primas, prácticas higiénicas, condiciones ambientales, etc..

Esto compromete a cada empresa de la Industria Farmacéutica, a tener un conocimiento amplio de los productos que fabrica y por ende, de todos los efectos que estos productos pueden tener sobre los pacientes que los usan.

Esto significa que debe asegurar que todos los lotes de todos sus productos sean **SEGUROS Y EFICACES**, es decir, que además de garantizar el efecto terapéutico deseado para el cual fue diseñado, cada medicamento debe asegurar que no causará un problema adicional, que en muchos casos puede llegar a ser irremediable (22, 24, 27, 40).

El riesgo de un fármaco contaminado, radica en la capacidad de los microorganismos para multiplicarse dentro del producto. El uso de materias primas contaminadas, el manejo inapropiado del producto durante la fabricación y acondicionamiento, o bien durante su uso, pueden ocasionar cuentas bacterianas altas al tiempo de administración, y como consecuencia, el deterioro del fármaco, que puede manifestarse en un cambio de color, sabor, disminución de la potencia, cambios de identidad farmacéutica, presencia de pirógenos, etc., que ponen en riesgo la salud del hombre (31).

Debido a su estructura, los microorganismos son más tolerantes a cambios en las condiciones ambientales, que organismos superiores. La gran capacidad de ciertas especies para sobrevivir bajo condiciones extremas de temperatura, cantidad de oxígeno, nutrientes, etc., así como su habilidad para reproducirse en millones de organismos en periodos tan cortos como días y aún en horas, hacen que estos diminutos seres vivos, prácticamente se encuentren en todos lados (27, 35).

En términos generales, habrá más abundancia de microorganismos en lugares húmedos, en los cuales haya sustancias alimenticias y condiciones ambientales favorables.

Para protección del paciente y del fabricante, es importante que se establezcan medidas apropiadas para asegurar la calidad microbiológica de los productos. Se hace necesaria la conservación de niveles bajos de microorganismos en materias primas no estériles, para elaborar productos terminados sin microorganismos indeseables, principalmente patógenos (22, 27, 35).

Ahora bien, si se ha establecido la necesidad del control microbiológico de un procedimiento particular, materia prima o equipo, es necesario establecer niveles normales, niveles de alerta y niveles de acción.

Un nivel normal, es el que se obtiene repetitivamente bajo condiciones controladas.

Un nivel de alerta, es un valor que muestra una tendencia fuera de condiciones normales, e indica que las cuentas microbianas son mayores que las esperadas. Un nivel de alerta, no requiere necesariamente una acción correctiva, origina pruebas adicionales y una mayor frecuencia de análisis para determinar las causas de las cuentas elevadas.

Finalmente, los niveles de acción, son valores que establecen condiciones anormales de un proceso, y requieren de acciones correctivas inmediatas.

Los niveles de alerta y de acción, se establecen como resultado de procesos de validación, o bien, a partir de datos anteriores suficientes que permitan determinarlos (35, 40, 54).

Un programa de rutina para controlar la calidad microbiológica de fármacos nos permite:

- 1.- Identificar aquellos productos que son más susceptibles a la contaminación microbiana.
- 2.- Identificar las fuentes y especies contaminantes.
- 3.- Establecer las medidas necesarias para su eliminación.

El propósito de este trabajo, es el de evaluar los aspectos cuantitativos, a través del muestreo ambiental de las diferentes áreas en las que se manufacturan productos farmacéuticos no estériles; evaluar los aspectos cualitativos, mediante la utilización de un sistema rápido de identificación y, finalmente establecer controles que eviten en lo posible, la contaminación de dichas formas farmacéuticas.

En la primera etapa, se realizarán los muestreos ambientales básicamente, utilizando un muestreador de impactación sobre agar, como el SAS Compact. Este instrumento proporcionará muestras comparativamente representativas de la contaminación del aire, en

**cada una de las áreas de producción de fármacos no estériles de la Planta de Producción. La segunda etapa que se abordará, será la identificación de los microorganismos que se recobren del muestreo ambiental. Dichas identificaciones se realizarán utilizando un sistema de identificación rápido que se denomina API.**

**Una vez que se hayan reunido los resultados de ambas etapas, se establecerán los controles necesarios, para que en los monitoreos subsecuentes se tenga un mejor manejo del ambiente de fabricación y en consecuencia, se obtenga un producto de calidad.**

## **GENERALIDADES**

## **2.1 CONTAMINACION DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS**

El problema de la contaminación de productos farmacéuticos es conocido ampliamente, y se define como "la presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables en un producto", introducidas durante la fabricación, almacenamiento o distribución del fármaco (19, 27).

## **2.2 FUENTES DE CONTAMINACION MICROBIANA EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS**

Prácticamente, los microorganismos son capaces de sobrevivir y desarrollar en cualquier lugar dentro de una Planta Farmacéutica, por lo que se debe evitar cualquier condición favorable (24).

En 1978, Flaum (27), enlistó las siguientes áreas como fuentes de contaminación:

- instalaciones
- personal
- materias primas
- equipo
- procesos
- acondicionamiento del fármaco

### **Instalaciones**

Los edificios en los que se fabrican y empaacan productos farmacéuticos, deben ser de tamaño, construcción y localización adecuada, de tal forma que se facilite su mantenimiento y limpieza.

Las áreas productivas y las instalaciones para formulaciones y almacenamiento, así como las rutas para el flujo de productos, deben estar separadas unas de otras, tanto como sea posible. El diseño de una planta indica que las áreas de producción se deben

subdividir, con la finalidad de evitar el paso físico del personal por áreas donde se esté llevando a cabo un proceso. El acceso a estas unidades, se debe condicionar a un sistema de doble puerta, que permita abrir y cerrar las puertas en tiempos diferentes. Los cuartos deben mantenerse con un sistema de aire balanceado.

Una vez que se han delimitado cada una de las áreas, es necesario que se defina la actividad que se realizará en cada una de ellas, para prevenir la contaminación tanto microbiológica como cruzada; esta última se refiere a la contaminación de los productos farmacéuticos con agentes sensibilizantes y/o potentes a bajas concentraciones, provenientes de otros productos. Lo anterior implica que, deberán existir procedimientos que regulen las actividades de fabricación de manera tal, que se evite la simultaneidad de operaciones en etapas que impliquen la posibilidad de confusión o el riesgo de una contaminación cruzada (19).

Se sugiere la existencia de:

- 1.) **Áreas de recepción, identificación y retención de materias primas, material de empaque y envases pendientes de muestreo así como para análisis, por parte de la unidad de Aseguramiento de la Calidad.**
- 2.) **Áreas de retención de materiales rechazados.**
- 3.) **Áreas de almacenamiento de materiales en proceso.**
- 4.) **Áreas para operaciones de producción (fabricación).**
- 5.) **Áreas para operaciones de empaque (acondicionamiento).**
- 6.) **Áreas para almacenar productos en cuarentena, antes de ser aprobados.**
- 7.) **Áreas para almacenar productos después de ser aprobados.**
- 8.) **Áreas para operaciones de laboratorio y control.**

Otro aspecto importante es el sistema de extracción, el cual debe estar provisto de salidas que eliminen polvos y otras partículas durante el proceso de fabricación. Adicionalmente, los materiales usados en los recubrimientos de las superficies interiores del edificio de producción, deben ser lisas y de limpieza fácil.

El edificio de fabricación debe ser construido con materiales lisos y no porosos. Si esto no fuera posible, las superficies deberán sellarse con materiales que no liberen partículas al medio ambiente. La elección del piso, por su parte, merece atención especial; éste debe ser capaz de resistir el peso sin romperse y deberá tener una pendiente hacia el desagüe. La superficie debe ser lisa pero no resbaladiza. Las uniones de pared y piso deben estar redondeadas, es necesario evitar esquinas que puedan acumular polvo. Cualquier esquina proyectada, particularmente al derredor de la puerta de entrada, debe ser protegida con placas metálicas.

Las ventanas deben encuadrar al ras de la pared, ya que las repisas favorecen el hacinamiento de polvo y otras partículas. Todas las ventanas deben ser de una pieza, para evitar que se abran.

Los techos representan un problema particular, deben ser construidos con materiales no porosos, de terminado liso y que no libere partículas.

La iluminación debe ser adecuada en todas las áreas (9, 18, 22, 27).

### **Personal**

El personal directamente involucrado en los procesos de producción, juega un papel crucial, ya que su presencia constante, impacta directamente la calidad del producto. La movilización de la gente, dentro y fuera de las áreas de producción, los constituyen como acarreadores potenciales de contaminación. Caminar, conversar y hasta respirar, puede diseminar bacterias y polvos.

Debe haber un número adecuado de personas para realizar y supervisar todas las operaciones de fabricación, proceso, empaque y almacenamiento de producto.

Solo el personal autorizado por los supervisores, puede entrar a las áreas de acceso restringido.

El personal debe usar ropa limpia y el equipo de seguridad necesario para la tarea que realiza, con la finalidad de proteger al producto de una posible contaminación.

Debe practicar buenos hábitos de limpieza.

Quienes trabajan en áreas de producción, deben estar sujetos a requerimientos estrictos de salud, además de seguir rutinas prescritas para el cambio de uniformes, zapatos y guantes.

La ignorancia y la indiferencia, pueden hacer fracasar el sistema más sofisticado, por lo que se debe establecer un programa continuo de capacitación (18, 27, 38, 59).

### **Materias primas**

Uno de los factores más importantes, para garantizar la calidad de los productos farmacéuticos, es la calidad de sus materias primas. Todos los materiales usados en las formulaciones, se deben obtener a partir de fuentes confiables, retenerse en la planta después de ser recibidos y probar su calidad antes de usarse.

Generalmente, las sustancias obtenidas a partir de síntesis orgánicas, se encuentran en estado sólido y usualmente se trata de polvos, los cuales presentan un contenido microbiano bajo. Sin embargo, las materias primas de origen natural; por ejemplo, las de origen mineral que no han sido tratadas, como talco, bentonita y caolín, por mencionar algunas, pueden estar contaminadas con una gran variedad de microorganismos propios del suelo.

Las materias primas de origen vegetal como gomas y almidón, normalmente están contaminadas con microorganismos asociados con su origen como *Erwinia sp.*

En cambio, algunas materias primas de origen animal, como las gelatinas, pueden estar contaminadas con patógenos.

También es importante considerar los materiales en que son envasadas. El cartón, papel o recipientes metálicos, pueden ser fuentes de contaminación y tienen que ser limpiados de polvo y asegurar que no permitan (por roturas o permeabilidad), la introducción de microorganismos del ambiente o humedad que favorezca la proliferación microbiana.

El agua en la Industria Farmacéutica, es el elemento más utilizado. Es la materia prima más importante de casi todas las formas farmacéuticas; también es un agente de limpieza para las áreas y equipos en que se fabrican los medicamentos.

Siendo un elemento necesario en la fabricación de fármacos, también es un medio de transporte donde pueden desarrollarse un sinnúmero de contaminantes microbiológicos.

Bacterias como *Pseudomonas sp.*, *Flavobacter sp.*, *Chromobacter sp.* y *Serratia sp.*, se encuentran frecuentemente en el agua potable. Además del riesgo que representa en sí la presencia de bacterias contaminantes del agua, con frecuencia se trata de bacterias gramnegativas, que son las responsables de la presencia de pirógenos (24, 27).

## **Equipo**

El equipo utilizado en la fabricación, proceso, empaque y almacenamiento, debe ser adecuado en diseño, tamaño y localización para facilitar su limpieza y mantenimiento. Las superficies que están en contacto con el producto, no deben ser reactivas, aditivas o absorbentes, ya que afectarían la calidad, integridad y pureza del producto.

Cualquier sustancia utilizada para la operación, como lubricantes o refrigerantes, no deben estar en contacto con el producto ni con el material de empaque primario.

Se deben escribir procedimientos para la limpieza y mantenimiento de equipo y utensilios usados en la producción, acondicionamiento y almacenamiento, éstos deben incluir:

- asignación de responsabilidades para la limpieza y mantenimiento del equipo.
- establecer un programa de mantenimiento, sanitización y limpieza.
- describir detalladamente los métodos, equipo y materiales usados en la limpieza y mantenimiento y los métodos para desarmar y armar el equipo, asegurando de esta manera un mantenimiento y limpieza adecuados.
- protección del equipo limpio antes de ser utilizado.

Dichos procedimientos, no están limitados a los lineamientos sugeridos anteriormente.

Microbiológicamente, el grado de contaminación de los equipos en una planta farmacéutica, dependerá de la posibilidad de que los microorganismos encuentren condiciones propicias para su desarrollo. La presencia de contaminantes y en particular bacterias gramnegativas, se dan con facilidad en espacios muertos (uniones, juntas, válvulas, etc.), por ello, es importante que las superficies sean lisas y que no tengan zonas que no se puedan limpiar fácilmente. Los equipos deben ser desmontables. Las partes que tienen contacto con el producto y el medio ambiente deben ser sanitizadas e incluso esterilizadas si el equipo así lo permite (18, 22, 27).

## **Procesos**

Debe haber procedimientos escritos para la producción y control de procesos, que aseguren la calidad, pureza, identidad y potencia del producto. Estos procedimientos deben incluir cualquier cambio que sufran y además, ser aprobados por Aseguramiento de la Calidad.

Los procedimientos escritos deben seguirse fielmente. Cualquier desviación debe documentarse y justificarse.

Debe haber procedimientos escritos para prevenir la contaminación de microorganismos patógenos de productos no estériles, y éstos deben seguirse.  
Debe haber procedimientos que prevengan la contaminación de productos que van a esterilizarse, e incluir la validación de los mismos (18).

### **Acondicionamiento del fármaco**

Otras fuentes de contaminación microbiológica, son los materiales de envase que están en contacto directo con los productos farmacéuticos.

El acondicionamiento del fármaco es la etapa final del proceso de fabricación, y es un procedimiento particularmente importante. La manipulación del producto terminado puede introducir o aumentar los niveles de microorganismos indeseables. Idealmente, todos los fármacos deberían acondicionarse en un ambiente aséptico, independientemente de su forma de dosis.

La elección del contenedor adecuado para cada producto farmacéutico es un aspecto muy importante.

A continuación, se describirán características importantes de diferentes contenedores y empaques utilizados en el acondicionamiento de productos farmacéuticos.

### **Contenedores de vidrio**

La estabilidad química de los contenedores de vidrio para uso farmacéutico, está dada por su resistencia hidrolítica, esto es, que resista la liberación de sustancias minerales solubles en agua bajo las condiciones prescritas de contacto entre la superficie interna del contenedor y el agua.

En base a su resistencia hidrolítica, los contenedores de vidrio se han clasificado en:

- **Contenedores de vidrio tipo I.** Estos son de vidrio neutro y tienen una alta resistencia hidrolítica, debido a la composición química del vidrio en sí.

Estos contenedores se utilizan, en general, para cualquier preparación, ya sean o no para uso parenteral o para sangre humana y componentes sanguíneos.

- **Contenedores de vidrio tipo II.** Usualmente son de sílica alcalina, y tienen una alta resistencia hidrolítica, producto del tratamiento que se le da a la superficie.

Estos contenedores se utilizan normalmente para preparaciones acuosas de uso parenteral con un pH menor a 7. Es necesario verificar la estabilidad de cada preparación en estos contenedores.

**- Contenedores de vidrio tipo III.** Están hechos de sílica alcalina y tienen una moderada resistencia hidrolítica.

Estos contenedores están dispuestos para preparaciones no acuosas de uso parenteral, para polvos de uso parenteral y para preparaciones de uso no parenteral. Las ampollas con capacidad superior a 20 ml., para líquidos de uso oral, están hechas a partir de vidrio con una resistencia hidrolítica superior a la de los contenedores de vidrio tipo III.

**- Contenedores de vidrio tipo IV.** Estos contenedores son de sílica alcalina y tienen una baja resistencia hidrolítica.

Los contenedores de tipo IV se utilizan para preparaciones sólidas, algunos líquidos y preparaciones semi-sólidas de uso no parenteral.

Para las preparaciones de uso no parenteral, se puede usar tanto vidrio transparente como contenedores de vidrio con color. Las preparaciones de uso parenteral, normalmente vienen en contenedores de vidrio con color, aunque estos contenedores pueden usarse también para sustancias conocidas que sean fotosensibles. Todos los contenedores usados para preparaciones líquidas y polvos de uso parenteral, deben permitir la inspección visual del contenido.

Exceptuando a los contenedores de vidrio tipo I, ningún otro tipo de contenedor de vidrio usado para preparaciones farmacéuticas puede ser reutilizado.

### **Contenedores plásticos**

Los contenedores plásticos para productos farmacéuticos, están hechos a base de polímeros como el polietileno (de baja o alta densidad), polipropileno, policloruro de vinilo, politereftalato de etileno y copolímeros de acetato de vinil-etileno. Además se utilizan aditivos como antioxidantes, estabilizadores, plastificadores, lubricantes, y sustancias colorantes.

Los contenedores pueden ser bolsas o botellas. Deben hacerse pruebas que aseguren que el contenedor no presenta fugas, ser resistente a la tensión de uso, resistir condiciones de esterilización.

Se debe tener cuidado con el método de esterilización seleccionado, ya que todas las partes del contenedor que estén en contacto con el producto deben ser esterilizadas.

Los contenedores deben ser impermeables a la presencia de microorganismos después de cerrarse. Después del llenado, debe ser resistente al daño por congelación accidental, que pudiera ocurrir durante el transporte. A menos que se justifique y autorice de otra manera, los contenedores plásticos deben ser transparentes de tal forma, que permitan examinar la apariencia del contenido en cualquier tiempo.

Si es necesario, para el acondicionamiento satisfactorio de la preparación, el contenedor debe ser cerrado y protegido con un sobresello.

### **Contenedores de aluminio**

Las cremas son formulaciones especialmente difíciles de preservar adecuadamente, el uso de tubos de aluminio ha ofrecido un progreso substancial en el mantenimiento de la integridad microbiológica, esencialmente, lo que hacen, es minimizar el riesgo de contaminación, ya que el área de contacto entre el producto y la piel del paciente es pequeña.

En el caso de las tabletas y cápsulas, el advenimiento de tiras de aluminio, como empaques individuales, elimina aún el menor riesgo, por lo tanto, mejora la integridad microbiológica del producto.

La introducción de empaques de dosis única es una ventaja que mejora, indudablemente, la calidad microbiológica de todos los fármacos no estériles. En estos sistemas, la calidad microbiológica depende de la limpieza del empaque y del proceso de fabricación; este aspecto no se compromete aún y cuando el paciente mismo sea el que se administre el medicamento.

### **Características ideales de un contenedor**

- Proporcionar resistencia a la contaminación a través de un buen diseño.
- Permitir la esterilización por el método óptimo ( en el caso de productos estériles).  
Requiere de ciertas características como resistencia térmica, resistencia a la radiación y el mantenimiento de sellos herméticos bajo presión.
- No interactuar con la formulación por absorción de los componentes activos o excipientes, especialmente preservativos.
- No liberar materiales al producto (por ejemplo, álcalis provenientes de vidrio, antioxidantes provenientes de polietileno, plásticos derivados de PVC), o alterar las

características del producto, que pudieran afectar adversamente la eficacia de los preservativos.

- Suministrar accesos disponibles para pruebas microbiológicas.
  - Evitar la adhesión microbiana.
  - Suministrar protección a la luz para preservativos fotosensibles.
- (9, 12, 18, 19, 22)

### **2.3 FACTORES QUE AFECTAN LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE ORGANISMOS EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS**

Los microorganismos no sólo son capaces de sobrevivir sino también de desarrollarse en medios con condiciones físicas y químicas diversas. Sin embargo, hay ciertas condiciones limitantes y específicas que los microorganismos pueden tolerar para sobrevivir.

El tipo y grado de contaminación microbiana a la que puede estar expuesto un fármaco, está influenciado por el estado fisicoquímico de la formulación (22, 48).

#### **2.3.1 TAMAÑO DEL INOCULO**

Por lo general, niveles bajos de contaminantes microbianos, no desarrollan en el producto, por lo que la velocidad de deterioro del fármaco es mínima; mientras que niveles altos introducidos por los ingredientes, durante el proceso o por el uso, puede producir un ataque uniforme apreciable, aún sin que haya proliferación.

Por definición, la fase "lag" es una fase de retardo, en la que la población microbiana permanece temporalmente inalterada, esto no quiere decir que sea inactiva o esté latente, por el contrario, cada una de las células incrementa su tamaño más allá de dimensiones normales, en este momento, se encuentran sintetizando protoplasma, enzimas y coenzimas necesarias para su división celular. Al final de la fase de retardo, cada microorganismo se divide, y si bien, no todos completan simultáneamente esta fase, hay un incremento gradual en la población hasta el final de este periodo, cuando todas las células son capaces de dividirse a intervalos regulares.

Considerando las implicaciones de la fase lag, puede incluso, darse un desarrollo rápido de microorganismos, que con frecuencia es de consideración para el producto (17, 33, 48)

### 2.3.2 FACTORES NUTRICIONALES

Un ataque microbiano importante a un producto farmacéutico, comúnmente requiere de un desarrollo apreciable del microorganismo contaminante dentro del fármaco. El ataque a muchos de los ingredientes orgánicos, produce metabolitos que pueden servir como una fuente de carbono o nitrógeno, favoreciendo el desarrollo microbiano, así mismo, pueden disponer de niveles suficientes de sales inorgánicas. Además, aún el agua destilada contiene nutrientes suficientes como para permitir el desarrollo de bacterias gramnegativas, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* que al tiempo de incubación y temperaturas adecuados, puede dar hasta  $10^5$  org/ml. También en el agua desmineralizada, producida por métodos de intercambio iónico pueden encontrarse concentraciones elevadas de desarrollo bacteriano (22, 33)

### 2.3.3 CONTENIDO DE HUMEDAD

Los microorganismos suspendidos en el aire, se encuentran sobre partículas de polvo y gotas de agua, llevadas a la atmósfera por la acción combinada de corrientes de aire y temperatura, propiciando un ambiente húmedo que favorece la proliferación microbiana. Las bacterias halofílicas, dependen necesariamente de un nivel alto de humedad para poder desarrollar, sin embargo, muchos microorganismos no requieren de una gran cantidad de agua para crecer; por esta razón, la actividad del agua se ha disminuido en las formulaciones con la adición de niveles convenientes de azúcar, polietilenglicol, cloruro de sodio (alimentos) o bien por secado. El cloruro de litio es más efectivo que el cloruro de sodio, pero presenta actividades farmacológicas indeseables, razón por la cual no se utiliza (8, 17, 33).

### 2.3.4 POTENCIAL REDOX

El balance oxidación-reducción de una formulación está determinada en parte, por su contenido de oxígeno y por sus ingredientes. Muchos microorganismos aerobios y facultativos, pueden desarrollar en condiciones de potencial redox relativamente bajas. Sin embargo, no sería una propuesta práctica eliminar el oxígeno en los procesos de fabricación, ya que potenciales redox suficientemente bajos, permitirían el desarrollo de anaerobios facultativos y anaerobios estrictos (22, 33).

### **2.3.5. TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO**

El deterioro de un fármaco, puede ocurrir por arriba de  $-5^{\circ}$  a  $60^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, aunque pueden sufrir descomposición en los extremos de este intervalo de temperatura. Intervalos estrechos de temperatura estimularían el desarrollo de grupos particulares de microorganismos.

Abajo de  $-20^{\circ}\text{C}$ , el desarrollo y por lo tanto, el daño que puede sufrir el fármaco es mínimo.

Con respecto al agua destilada usada en la preparación de agua para inyectables, se recomienda que se mantenga a  $80^{\circ}\text{C}$  antes del proceso de esterilización, para prevenir la producción de pirógenos (22, 33)

### **2.3.6 PH**

pH's extremos, previenen el ataque microbiano, aunque se ha observado que algunos hongos pueden desarrollar en soluciones diluidas de ácido clorhídrico.

El desarrollo de microorganismos se da a pH neutro o muy cerca del neutral y, algunas bacterias pueden desarrollar, aunque mínimamente, bajo condiciones alcalinas. Condiciones débilmente ácidas, pueden favorecer la presencia de hongos y levaduras (22, 33).

## **2.4 RIESGOS DE INFECCION**

La posibilidad de que un fármaco contaminado con microorganismos, infecte a pacientes o al personal que trabaja en hospitales, depende de varios factores, tales como: el tipo de microorganismos, la virulencia de la cepa, la dosis infectiva y la resistencia del huésped a la infección, principalmente.

### **2.4.1 TIPO Y VIRULENCIA DEL MICROORGANISMO**

Los microorganismos pueden clasificarse en:

- patógenos
- oportunistas
- no patógenos

Microorganismos como *Salmonella*, *Shigella* y *S. aureus*, se consideran patógenos, mientras que *S. epidermidis*, *St. viridans* y algunas especies gramnegativas, son no patógenos. Sin embargo, la situación no es tan simple, ya que muchas bacterias consideradas no patógenas, son capaces de ocasionar infección cuando la resistencia del huésped es muy baja; por ejemplo, *S. epidermidis* puede ocasionar septicemia en niños cuyo alumbramiento fue prematuro y, más aún, *St. viridans* es un agente etiológico clásico de endocarditis, especialmente en pacientes con padecimientos cardíacos congénitos o en aquellos que tienen válvulas cardíacas debido a enfermedades reumáticas.

Esto implica que, casi cualquier microorganismo es capaz de causar alguna patología si la dosis infectiva es muy alta, si la vía de administración fue la adecuada y si la resistencia del huésped es baja.

Los microorganismos patógenos, pueden causar infección en individuos sanos, los patógenos oportunistas son capaces de causar daño cuando la resistencia del huésped es baja (huéspedes comprometidos inmunológicamente), y los no patógenos, que raramente ocasionan cuadros infectivos con consecuencias patológicas. La virulencia de los patógenos, así como el grado de patogenicidad, puede variar entre diferentes cepas de la misma bacteria.

#### 2.4.2 DOSIS INFECTIVA

Estudios realizados en 1951, determinaron que la dosis infectiva, forma parte de una serie de factores que en forma conjunta causan enfermedad. Así, la infección dependerá no sólo de la dosis, sino también de las diferencias entre cepas y la resistencia del paciente.

#### 2.4.3 VIAS DE INFECCION

Los riesgos de infección asociados a fármacos contaminados, depende en gran parte de la vía a través de la cual se administre. En general, el riesgo de infección para el paciente es muy reducido, cuando hace uso de preparaciones farmacéuticas que se administran por vía oral o por vía cutánea, en comparación con los riesgos que conlleva el uso de

inyectables y formulaciones que estarán en contacto con piel lesionada, membranas mucosas y partes estériles de nuestro cuerpo.

#### 2.4.3.1 Medicinas orales

Estudios recientes sugieren que un número bajo de microorganismos, principalmente no patógenos, son generalmente bien tolerados y raramente pueden causar infección, sin embargo, se conocen reportes diversos de infecciones causadas por especies diferentes de *Salmonella*, contenidas en presentaciones farmacéuticas de tipo oral. Más recientemente, (1984) se dió a conocer un reporte de septicemia causada por el uso de un enjuague bucal de timol, contaminado con *Ps. aeruginosa* (22, 46).

#### 2.4.3.2 Administración tópica

Aunque la piel intacta representa una barrera eficiente contra la infección, en piel lesionada el riesgo se incrementa substancialmente. Los contenedores multidosis, particularmente aquellos usados por más de una persona, están propensos a ser contaminados, sobre todo en ambientes hospitalarios.

Uno de los primeros reportes (1946), señaló una infección mortal en bebés, causada por el uso de talco contaminado con *Clostridium tetani*. Se conoce también el caso de un brote de septicemia en una unidad de terapia intensiva, originada por el uso de una crema contaminada con *K. pneumoniae*.

En 1981, se reportó la contaminación, por varios microorganismos, de una crema de clorhexidina, usada para prevenir infecciones en pacientes cateterizados, esta contaminación fue asociada con infecciones del tracto urinario, sufridas por un número de los pacientes a quienes se aplicó la crema (5, 22, 43).

#### 2.4.3.3 Infecciones del tracto respiratorio

Las infecciones nosocomiales del tracto respiratorio, involucran a bacterias gramnegativas, reportadas frecuentemente en nebulizadores y humidificadores usados en terapia de inhalación. Se ha implicado a *Klebsiella spp.* y a *S. marcescens* en casos de infección pulmonar, originada por el uso de aerosoles contaminados con estos microorganismos (22).

#### 2.4.3.4 Preparaciones oftálmicas

Aunque la esterilidad es un requerimiento de farmacopea, se tiene conocimiento de un brote de *Ps. aeruginosa* en preparaciones oftálmicas (1966), este microorganismo en una preparación farmacéutica de este tipo, causa ulceración de la cornea y en consecuencia, ceguera. Recientemente, se ha reportado un número de casos de queratitis, por el uso de gotas contaminadas con *S. marcescens*, que originalmente contaminaban el frasco gotero (22)

#### **2.4.3.5 Inyecciones**

**Indudablemente**, muchas infecciones serias se han asociado con el uso de inyectables contaminados, que pueden originar bacteremia, desencadenar un choque y sobreviene la muerte del paciente.

En 1973, se identificaron 80 cepas bacterianas diferentes, principalmente enterobacterias, pseudomonas y coryneformes, asociados con dos brotes de infección por el uso de fluidos intravenosos (22).

#### **2.4.4 RESISTENCIA DEL PACIENTE**

La resistencia que puede presentar el huésped frente a la infección microbiológica, depende de elementos inespecíficos, como son los factores mecánicos y químicos, la edad, el estado nutricional, el balance hormonal, etc., todo esto mediado a través del sistema inmunitario (22, 49).

## **2.5 CONDICIONES AMBIENTALES**

Los productos farmacéuticos a los cuales no se les exige la esterilidad, representan un medio apropiado para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos, cuya presencia en número elevado puede disminuir la calidad del producto farmacéutico en diferentes formas. Aunado al impacto que tiene el medio ambiente de fabricación sobre la calidad del fármaco (22, 24).

El aire no es un ambiente adecuado para el crecimiento de microorganismos porque carece de humedad y nutrientes. Sin embargo, si constituye un medio en el cual se transportan microorganismos adheridos a partículas de polvo, gotitas de saliva y sudor, ropa, etc.

La sedimentación dependerá del tamaño y peso de las partículas en que se encuentran suspendidos, así como la velocidad y turbulencia del aire.

Evidentemente, la calidad microbiológica en una área, mejora cuando el medio ambiente y el personal son controlados con respecto a la contaminación por partículas suspendidas en el aire y se mantiene un control adecuado de las actividades del personal.

Las áreas de fabricación para productos no estériles, aún cuando se permita cierto grado de contaminación, deben tener control, principalmente donde se tienen los productos expuestos al ambiente, como las áreas de mezclado, compresión de tabletas, llenado de líquidos, polvos, etc., todas estas actividades deberán hacerse en áreas cerradas con un nivel microbiológico adecuado (24, 34, 36).

### **2.5.1 MUESTREO AMBIENTAL**

Por definición, muestrear es la medición de parámetros en orden, que estiman la condición de una área, producto o proceso.

Su propósito es el de confirmar que los índices definidos, se encuentran dentro de límites, o bien, que éstos se han excedido y requieren de acciones correctivas.

En este caso particular, se hará referencia al muestreo del aire, que debe llevarse a cabo en lugares en los que el producto en proceso, tiene un gran potencial favoreciendo la contaminación de este por el medio ambiente.

La selección del método requiere de atención especial, ya que por la naturaleza de los graneles, el equipo de muestreo y las manipulaciones requeridas, se pueden alterar los patrones del flujo del aire y el ambiente de los muchos sistemas que están sujetos al muestreo. Lo anterior representa contratiempos que deben ser minimizados.

Los parámetros que deben considerarse en la selección de un método de muestreo principalmente incluyen la capacidad del muestreador para coleccionar el microorganismo de

interés, la sensibilidad y límites de detección del sistema, las restricciones de operación y los requerimientos físicos para el uso del equipo en el área de acción.

Al paso del tiempo se han desarrollado métodos diversos para detectar bacterias en el aire, como las radiactivas y enzimáticas, pero los que involucran medios de cultivo son los más usados. Estos métodos garantizan el desarrollo de los microorganismos y, subsecuentemente, la enumeración de colonias típicas. Estos métodos asumen que los microorganismos desarrollan en medios artificiales y producen una morfología colonial identificable en un tiempo específico. Sin embargo, los microorganismos que se encuentran sobre material particulado en el aire, sufren estrés, sobre todo durante el transporte, y pueden no responder a técnicas clásicas de cultivo.

Actualmente, se ha diseñado un gran número de muestreadores de aire, y los métodos en los que son utilizados se han categorizado como pasivos o activos, dependiendo de la fuerza de su flujo de aire (4, 7, 15, 26, 31, 39, 47, 54, 60).

Los métodos usados en el muestreo ambiental se clasifican en pasivos y activos:

#### **Métodos pasivos**

##### **- Exposición de placa**

Este es uno de los métodos usados ampliamente en el muestreo de microorganismos viables.

Se vale de cajas de Petri que contienen medio de cultivo estéril, que favorecerá el desarrollo microbiano, éstas son expuestas al medio ambiente. Los microorganismos viables se depositan en la superficie del medio y desarrollan después de someterlos a incubación. Cualquier microorganismo presente puede ser contado, identificado y evaluado en relación a los niveles de acción establecidos.

La exposición de placa es una técnica cualitativa básica, sencilla, portátil y económica, además, no requiere de subcultivos y permite que se hagan monitoreos continuos.

Su eficiencia depende del tamaño de partícula, la velocidad con que baja y la turbulencia. La deposición pasiva no se recomienda para partículas diminutas, por ejemplo bacterias, ya que pueden permanecer suspendidas por periodos largos, dando como resultado falsos negativos.

#### - Monitoreos de superficie con hisopo

Esta técnica consiste en esterilizar algodones, que después son humedecidos en medios de cultivo líquidos o en diluyentes estériles. El algodón, que está sujeto por un soporte, a manera de hisopo, es friccionado con movimientos giratorios sobre la superficie a monitorear, y después inmerso en un medio de cultivo estéril. Se recomienda monitorear 4 in<sup>2</sup>, por área en estudio.

A través de este método, podrían cuantificarse las unidades formadoras de colonias, si se filtra el contenido del tubo a través de una membrana, aunque no es muy recomendable.

El monitoreo de superficie con hisopo se considera conveniente cuando se desea monitorear superficies irregulares. Se trata de una técnica francamente cualitativa (42, 46, 51).

#### **Métodos activos**

Para aumentar la detección de microorganismos en el aire, se usan muestreadores activos con un flujo de aire inducido mecánicamente, diseñado para forzar la entrada del aire a través de él o bien, sobre superficies de muestreo.

Los muestreadores activos disponibles para la investigación de microorganismos en diferentes áreas, incluyen aquellos que contienen filtros, muestreadores electrostáticos de alto volumen, muestreadores centrifugos e impactadores. Por su gran aplicación, nos referiremos específicamente a los centrifugos, a los impactadores en agar y a los de impactación en líquidos.

#### - Muestreador centrifugo

Este equipo opera con un mecanismo que aspira 30 lt. de aire/minuto, a través de hojas rotantes. Las partículas en el aire, son arrojadas por fuerzas centrifugas contra una tira con agar nutritivo. El volumen de aire muestreado, debe ser relacionado con los niveles de contaminación esperados en el área. La unidad es portátil, se sostiene con la mano y no requiere de vacío o de una fuente de poder. Algunas partes de este equipo pueden ser esterilizadas con vapor.

- Muestreadores de aire para la detección de microorganismos

TIPO DE MUESTREADOR	SUPERFICIE DE COLECCION	m <sup>3</sup> AIRE/MIN	USO	CONSIDERACIONES ESPECIALES
Caja o lámina	Agar o película engomada	N. C.	E	Simple, económico.
Filtro electrostático	Filtros	0.001	A	Menor viabilidad
	Líquidos	0.4 - 15	B, V	Complejo, difícil de esterilizar.
Ciclón centrifugo	Líquidos	0.001 - 0.4	V	Sujeto a humedad, autoclaveable.
XM2 Reuter	Líquidos	1.5	B, V	Difícil de esterilizar
	Agar	0.04	B	Fácil de desinfectar
Impactador Andersen Casella Burkard	Agar	0.028	B	Tamaño de partícula.
	Agar	0.03	B	Resultados tardados.
	Agar	0.01	E	Requiere 24 h-7 días para dar datos. Uso bajo cubierta.
Impinger AGI-30 May	Líquidos	0.0125	B	Incrementa el recobro.
	Líquidos	0.0125	B	Tiene un flujo de aire más ligero.

Significado de las abreviaturas: N. C. = No cuantificable; B = Bacterias; E = Esporas; V= Virus.

#### - Muestreo por impactación en agar

El muestreo por impactación en agar emplea una placa giratoria, que contiene un medio soporte, disponible para el desarrollo, bajo un orificio fijo. El volumen de aire muestreado, puede ser relacionado con el nivel de contaminación esperado en el cuarto. El método es portátil, eficiente, tanto cualitativo como cuantitativo, proporciona una concentración en relación con el tiempo y no requiere de subcultivos. Se requiere de una fuente de vacío.

Estos modelos tienen una fuente de vacío integrada, lo cual proporciona una gran ventaja, además, la bomba puede limpiarse cuidadosamente.

Aunque la unidad entera no puede ser esterilizada con vapor, si puede ser sanitizada con agentes apropiados, alcoholes por ejemplo. Algunas partes pueden quitarse y esterilizarse en forma separada.

Este instrumento no debe ser usado durante operaciones de llenado de polvos secos sin precauciones, ya que el polvo almacenado puede causar daño al instrumento.

#### - Impactación en líquidos

En estos equipos, el aire es aspirado dentro de la unidad por medio de vacío. El volumen de aire aspirado se determina por un orificio capilar limitado. Las partículas y microorganismos presentes en el aire, son impactados en el líquido a muy alta velocidad. Al final del período de muestreo, la solución en la cual el aire fue impactado es filtrada a través de una membrana.

La unidad es económica, altamente eficiente y cuantitativa. Las unidades de vidrio son cerradas fácilmente y esterilizadas, sin embargo, su manejo debe ser muy cuidadoso debido a su fragilidad. Se requiere de una fuente de vacío para operar el instrumento.

El líquido colector (solución salina 0.85 % normalmente), puede requerir la adición de un agente antiespumante (14, 23, 26, 35, 42, 51).

A continuación, se mencionarán las ventajas y limitaciones de los principales métodos de muestreo que se utilizan en la evaluación microbiológica del aire.

VENTAJAS	LIMITACIONES
<b>A) Muestreadores de impactación</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Suministra información tiempo/concentración.</li> <li>· Alta eficiencia de colección.</li> <li>· No requiere de subcultivos.</li> <li>· Es portátil.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· No se recomienda cuando la concentración de microorganismos es muy alta.</li> <li>· Requiere de una fuente de vacío.</li> <li>· El equipo no puede esterilizarse.</li> <li>· Es muy voluminoso.</li> </ul>
<b>B) Muestreador Andersen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Capaz de separar partículas de diferente tamaño.</li> <li>· Los resultados se expresan por unidad de aire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· No se recomienda cuando la concentración de microorganismos es muy alta.</li> <li>· Puede ocurrir la superposición de partículas.</li> </ul>
<b>C) Muestreador centrífugo de aire</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Gran velocidad.</li> <li>· Es portátil.</li> <li>· Fuente de poder independiente.</li> <li>· Bajo nivel de ruido.</li> <li>· Proporciona aislamientos representativos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· La velocidad de muestreo varía directamente con el tamaño de partícula.</li> <li>· Requiere de calibraciones continuas.</li> <li>· Límites de detección.</li> <li>· El agar está propenso a la deshidratación.</li> </ul>
<b>D) Impactadores de cascada</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>· No requiere de subcultivos.</li> <li>· Suministra información tiempo/concentración.</li> <li>· Alta eficiencia de colección.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Requiere de condiciones totalmente asépticas.</li> <li>· Hay superposición de partículas.</li> <li>· El tiempo de muestreo es corto, por lo tanto, se detectan concentraciones bajas.</li> </ul>

<b>VENTAJAS</b>	<b>LIMITACIONES</b>
<b>E) Impactadores en líquidos</b>	
·Velocidad muy alta.	·Pueden requerirse diluciones de la solución colectora.
·Util cuando se tienen velocidades de flujo altas.	·Es necesario adicionar agentes antiespumantes.
·Económico.	·Es muy frágil.
	·Es muy voluminoso.
	·No se puede relacionar el tiempo de muestreo con los resultados que se obtienen.
<b>F) Filtración por membrana</b>	
·La velocidad de muestreo y el tiempo, son seleccionables.	·Los microorganismos pueden sufrir desecación.
·Su eficiencia de colección se califica de moderada a alta.	·Las membranas deben ser colocadas sobre la superficie de un medio nutritivo, para poder enumerar las partículas viables.
·Los resultados pueden relacionarse.	·El aire puede tener un efecto letal para microorganismos con "stress".
·Pueden usarse membranas de gelatina.	·Límites de detección altos.

(7,14,37,39,47).

## 2.6.- SISTEMA API

El sistema API 20 es un sistema estandarizado y definido para identificar bacterias de importancia clínica e industrial.

Consta de tres equipos de prueba:

- API-20E (Identifica bacterias Gramnegativas).
- API-20 GP (Identifica cocos Grampositivos).
- API-20C (Identifica hongos y levaduras).

El sistema API-20E, es una versión estandarizada y miniaturizada de procedimientos convencionales para la identificación de *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gramnegativas. Es un sistema constituido por microtubos listos para usarse, diseñado para la interpretación de 23 pruebas bioquímicas, de colonias bacterianas aisladas en medios de cultivo. En forma alterna se usa el sistema API de reconocimiento de perfiles, que identifica miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gramnegativas con precisión y facilidad. Este procedimiento de identificación requiere de 18-24 horas de incubación para enterobacterias y de 36-48 horas para identificar otras bacterias gramnegativas.

Este sistema contiene sustratos deshidratados, que son reconstituídos al adicionar suspensiones bacterianas, durante la incubación, el microorganismo en cuestión, reacciona con el contenido de los tubos y se leen cuando los diferentes sistemas indicadores son afectados por metabolitos o bien, adicionando reactivos, esto ocurre generalmente después de 18-24 horas de incubación a 35°-37°C.

En el caso del API-20GP, al igual que el anterior, es un micrométodo estandarizado muy sensible, que utiliza tanto pruebas cromogénicas como pruebas convencionales para identificación de 13 especies de estafilococos, 4 especies de enterococos y *St. bovis*. Cada prueba de la serie fue seleccionada basándose en resultados convencionales. También se trata de sustratos deshidratados que son reconstituídos con suspensiones bacterianas de los microorganismos en estudio. Requiere de 18-24 horas de incubación a 35°-37°C, posteriormente, se leen los resultados ya sea por la presencia de diferentes metabolitos o bien, por la adición de reactivos

Finalmente, el sistema API-20C, permitirá la identificación de hongos y levaduras clínicamente significativas, con este micrométodo se pueden interpretar 19 pruebas de asimilación. Las reacciones bioquímicas se completan después de 72 horas de incubación a 30°C.

**Consiste en una serie de pozos que contienen sustratos deshidratados para reacciones de asimilación, los sustratos son reconstituídos por la adición de una suspensión pura de levaduras en el medio basal de las cúpulas API-20C. Estas tiras son incubadas a 30°C y leídas en intervalos de 24, 48 y 72 horas.**

**El medio basal contenido en el mismo equipo, contiene una fuente de nitrógeno como factor de desarrollo (6, 10, 13, 16, 21, 25, 28, 41, 44, 45, 50, 52, 57).**

**PARTE  
EXPERIMENTAL**

## INDICE

SECCION	CONTENIDO
3.0	Definiciones
3.1	Plan de trabajo. Diagrama de Pert.
3.2	Areas de muestreo microbiológico.
3.2.1	Ubicación de las áreas que se muestrearán.
3.3	Selección del método de muestreo.
3.4	Frecuencia de muestreo.
3.5	Criterios generales de muestreo.
3.6	Selección del método de identificación.
3.7	Criterios generales de identificación.
3.8	Condiciones generales de identificación.
3.9	Selección del medio de cultivo.
3.10	Criterios generales para la preparación y utilización de medios de cultivo.
3.11	Número de muestreos ambientales. Tabla y gráfica.
3.12	Características coloniales. Tabla.
3.13	Resultados cuantitativos. Tablas.
3.14	Identificación bioquímica de microorganismos. Tabla.
3.15	Aislamientos por área.
3.16	Criterios considerados para establecer especificaciones microbiológicas. Tabla.
3.17	Gráficas y Planos de distribución.

### 3.0 DEFINICIONES

**FLORA RESIDENTE:** Se constituye por microorganismos que se adquieren pocos días después del nacimiento y permanecen durante toda la vida.

**FLORA TRANSITORIA:** Son microorganismos que normalmente no deben encontrarse en el huésped. La presencia de estos microorganismos, depende del estado de salud, hábitos de higiene, la dieta, la zona habitacional, la edad, las condiciones del sistema inmunológico, el consumo de antibióticos, etc..

**NIVELES DE ACCION:** Son valores que establecen condiciones anormales de un proceso, y requieren de acciones correctivas inmediatas.

**NIVELES DE ALERTA:** Se definen como valores que exceden las condiciones normales. Aunque no requieren de acciones correctivas, si se hace necesaria una frecuencia mayor de muestreos y análisis, que determinen las causas de las cuentas elevadas.

**NIVELES NORMALES:** Son lo que se obtienen repetidamente bajo condiciones controladas.

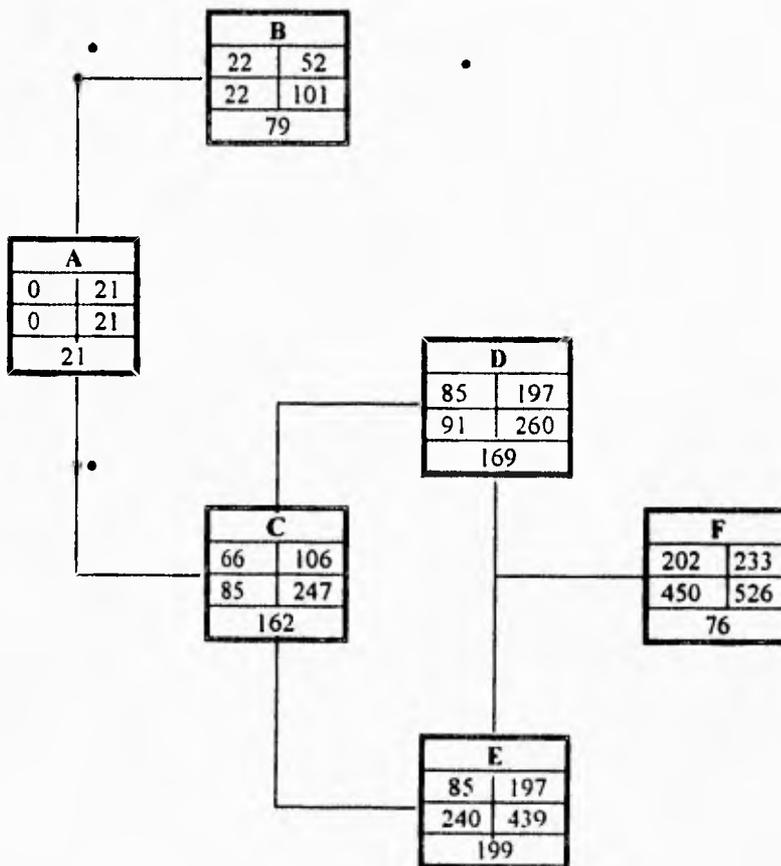
**PARAMETROS DE CONTROL AMBIENTAL:** Son mediciones y condiciones asociadas con instalaciones y equipo, utilizados en los procesos de manufactura, los cuales podrían impactar potencialmente la identidad, potencia, calidad y pureza de un producto farmacéutico. Involucra la velocidad del flujo de aire, flujo de materiales y personal, temperatura y humedad relativa, los cuales pueden originar la presencia de partículas viables y no viables.

**PORTADOR SANO:** Cuando un huésped es colonizado por microorganismos patógenos y no desarrolla enfermedad.

## PLAN DE TRABAJO

Las actividades a realizar, se describirán en paquetes de trabajo mediante un Diagrama de Pert.

### 3.1.- Diagrama de Pert



**DIAGRAMA DE PERT  
ACTIVIDADES GENERALES**

<b>APARTADO</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>FECHAS</b>
		290792 - 180194
<b>A</b>	Elección del método.	290792 A 310892
<b>B</b>	Revisión bibliográfica	010992 A 191192
<b>C</b>	Monitoreos ambientales	031192 A 230493
<b>D</b>	Macroscopia y microscopia	091192 A 270493
<b>E</b>	Identificación bioquímica	070493 A 231093
<b>F</b>	Resultados	031193 A 180194

**3.2.- MUESTREO MICROBIOLOGICO**

A continuación, se detallan las actividades que se realizan en cada una de las secciones y áreas que comprende el muestreo microbiológico, así como su ubicación dentro de la Planta de Producción.

En general todas las áreas que se muestrearán son muy grandes, y algunas de ellas tienen un gran número de cuartos o divisiones, como es el caso de la sección de acondicionamiento, esto se debe a que, en cada uno de ellos se llevan a cabo actividades diferentes.

### 3.2.1.- FABRICACION:

#### HORMONALES

En esta zona se realizan actividades de trituración, mezclado y secado de las materias primas para poder, posteriormente, fabricar las tabletas.

El acceso se marca con una línea punteada en el Plano de distribución N° 1.

AREA	EQUIPO	CLAVE
Tabletas OC'S I	Tabletcadora Manesty Express	OC-15
Tabletas OC'S II:	Tabletcadora Stokes-54-1	OC-16
Tabletas OC'S III:	Tabletcadora Stokes F-1	OC-18
Area de Secado	Hornos Stokes	OC-19
Area de Trituración OC'S	Fitz-Mill	OC-06
Area de Mezclado OC'S:	Mezclador en V	OC-05
Area de Granulación OC'S I:	Mezclador Day	OC-04
Area de Granulación OC'S II:	Mezclador Lodige	OC-03

#### LIQUIDOS Y CREMAS

El área de líquidos y cremas, ocupa una área común para realizar todas sus actividades, y dadas sus dimensiones, será dividida en seis zonas para efectos de muestreo.

Aquí se producen fármacos tanto hormonales como no hormonales.

El acceso se marca con una línea punteada en el Plano de distribución N° 2.

### OVULOS Y SUPOSITORIOS

En el área que ocupa la fabricación de óvulos y supositorios, se realiza el tren completo, es decir, se prepara desde la homogenización de la masa, la fabricación de óvulos y el acondicionamiento de estos fármacos; que van desde antipiréticos y antiinflamatorios hasta agentes antiinfecciosos.

El acceso se marca con una línea punteada en el Plano de distribución N° 2.

AREA	EQUIPO	CLAVE
Ovulos y supositorios I	Bonapace I	LC-10
Ovulos y supositorios II	Encartonadora Zanasi	LC-09
Ovulos y supositorios III	Sarong	LC-08

### SOLIDOS

La última subárea que se muestreará de la sección de fabricación, es la de sólidos; aquí se fabrican tanto tabletas y cápsulas como polvos para suspensión.

En ella se realizan actividades de secado, mezclado y granulación de materias primas y principios activos, para posteriormente, fabricar tabletas, cápsulas o bien, preparar polvo para suspensión.

El acceso se marca con una línea punteada en el Plano de distribución N° 3.

AREA	EQUIPO	CLAVE
Tabletas I:	Tableteadora Fette P31001	G-5
Tabletas II:	Tableteadora Fette P3100	G-3
Area de Granulación:	Glatt	G-28
Area de Mezclado:	Mezclador en V	G-23
Cápsulas I	Encapsuladora Zanasi AZ-20	G-18
Cápsulas II	Encapsuladora Zanasi Z-5000	G-19
Cápsulas III:	Encapsuladora Zanasi BZ-72	G-20

### 3.2.2.- ACONDICIONAMIENTO:

Finalmente, en la sección de  **acondicionamiento**, se colocan los productos en su empaque final para que salga al mercado. Esta es la sección más grande, cuenta con trece líneas en las que se acondiciona todo tipo de fármaco, independientemente de su base, ya sea seca, líquidos, cremas, óvulos, supositorios, hormonales y no hormonales.

Para cada uno de ellos, existe una línea especial de acondicionado.

El acceso se marca con una línea punteada en el Plano de distribución N° 4.

AREA	EQUIPO	CLAVE
Línea 1	Resina Screw Cappers	L-1
Línea 2	Comadis y Encartonadora Zanasi	L-2
Línea 3A	Etiquetadora King Marborg	L-3
Línea 3B	Etiquetadora King Marborg	L-3
Línea 4A	Fontanot y llenadora de líquidos Fillamatic	L-4
Línea 4B	Fontanot y llenadora de líquidos Fillamatic	L-4
Línea 5	Emblistadora Tren Kronos	L-5
Línea 6	Emblistadora Tren Scorpio	L-6
Línea 7A	Emblistadora "Partena" SpA M-80	
Línea 7B	Emblistadora "Partena" SpA M-80	L-7
Línea 8	Emblistadora Hassia	L-8
Línea 9	Llenadora de cremas Cáliz	L-9
Línea 10	Encartonadora Zanasi Nigris SpA Kub	L-10
Línea 11	Encartonadora Zanasi Nigris SpA Kub	L-11
Línea 12A	Encartonadora Zanasi Nigris SpA Ka	L-12
Línea 12B	Tren Perry	L-12
Línea 13	Tren Perry y etiquetadora King Marborg	L-13

### **3.3.- SELECCION DEL METODO DE MUESTREO**

Conociendo que las fuentes principales de contaminación microbiana que predominan en el ambiente, son el aire, el agua, los equipos de trabajo, las materias primas y el personal, se requería de un método que facilitara el desarrollo del muestreo. Para ello, se seleccionó un muestreador de impactación de aire en medios de cultivo sólidos, que es de los más efectivos en el muestreo del aire, además, es el único recurso con que se cuenta para el muestreo cuantitativo del ambiente. Este muestreador es el S.A.S. Compact ( Surface Air System), con la ayuda de este equipo, se recogerán muestras comparativas de contaminantes en el aire tomadas con el mismo muestreador, en tiempos diferentes y en lugares diferentes, con la finalidad de establecer parámetros con los resultados obtenidos entre muestras de un mismo lugar.

Se considera que los métodos de impactación son los mejores para el muestreo del aire, ya que su gran eficiencia de colección, así como sus volúmenes altos de muestreo, los hace ideales; además, algunos de ellos, son de operación sencilla y tienen un buen manejo de las muestras colectadas.

El método de operación y muestreo del aire, se describen con detalle en el Anexo N° 1.

### **3.4.- FRECUENCIA DE MUESTREO**

La frecuencia dependerá del programa de planeación de la producción, y se realizará:

- 1.- Después de introducir partes de equipo y materias primas, a las áreas de manufactura.
- 2.- Durante el proceso de fabricación.
- 3.- Inmediatamente después de que se lleve a cabo la fabricación de un producto.

### **3.5.- CRITERIOS GENERALES DE MUESTREO**

Se considera que dentro de los criterios generales de muestreo más sobresalientes, se encuentran los siguientes:

- Inicialmente, el equipo debe mantenerse en un lugar limpio y seco, alejado de fuentes de calor y humedad, ya que estas condiciones podrían alterar el mecanismo de operación del muestreador.
- El equipo en general debe mantenerse limpio, poniendo cuidado especial en las partes que se desmontan, las cuales, además de limpiarlas habrá que sanitizarlas.
- Se seleccionarán 9 unidades de aspiración, que equivalen a 270 L de aire impactados contra una placa con medio de cultivo sólido.
- Para insertar la placa con el medio de cultivo en el equipo, se debe desmontar la cubierta del muestreador e inmediatamente después, colocar la placa, sujetarla con las pinzas y volver a instalar la cubierta en su posición original; esta operación debe hacerse cuidadosamente pero también, rápidamente, ya que la placa que se inserta en el equipo, contiene medio de cultivo estéril, que podría contaminarse en esta operación y dar falsos positivos.
- Una vez concluido el muestreo del aire, se retira la placa del equipo, se tapa, y se sanitiza el muestreador. Se coloca la cubierta y habrá que esperar unos minutos hasta que el sanitizante se haya evaporado totalmente, antes de realizar otro muestreo.

### **3.6.- SELECCION DEL METODO DE IDENTIFICACION**

Se seleccionó un sistema de identificación rápida, denominado API ( Analytical Profile Index ). El sistema API 20 es un sistema estandarizado y definido para identificar bacterias de importancia clínica e industrial. Se eligió este sistema, porque son equipos muy sensibles, tienen un buen nivel de confiabilidad y están disponibles en el mercado.

Consta de tres equipos de prueba:

- API-20E (Identifica bacterias Gramnegativas).
- API-20GP (Identifica cocos Grampositivos).
- API-20C (Identifica hongos y levaduras).

El método de identificación, se describe con detalle en el Anexo N° 2.

### 3.7.- CRITERIOS GENERALES DE IDENTIFICACION

Esta parte se limita al criterio siguiente:

- Para poder instalar la prueba de identificación en el sistema API, es necesario darle tres pases al microorganismo en cuestión, con la finalidad de activarlo metabólicamente y readecuarlo a condiciones ideales de desarrollo.

### 3.8.- CONDICIONES GENERALES DE IDENTIFICACION

- La frecuencia con que se tengan que hacer identificaciones bacterianas, estará en función de los aislamientos que se vayan obteniendo después de los muestreos ambientales.
- Tanto el sistema como los reactivos utilizados en la identificación bacteriana, deben mantenerse bajo temperatura de refrigeración (2° - 8°C).
- A todos los aislamientos que se obtengan, posteriores al muestreo del aire, se les realizará un frote y después, una tinción de Gram. Una vez que se ha revisado la preparación en el microscopio, se debe registrar cada uno de los resultados obtenidos. Si se observan bacilos Grampositivos, se realizará una tinción con verde de malaquita, para poner en evidencia la presencia de esporas, en caso de que se tratara de un microorganismo esporulado.

- Se requiere de condiciones asépticas para la preparación del inóculo de prueba y homogenización de la suspensión bacteriana.

- Para la incubación de las tiras, se sugiere introducirlas en la parte intermedia de la incubadora e introducir recipientes con agua a la estufa, ya que se trabaja con reactivos deshidratados muy susceptibles a la desecación, después de que han sido reconstituidos con la suspensión bacteriana.

### 3.9.- SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO

Se seleccionó el agar casoy ( Agar peptona de caseína-peptona de harina de soya), porque es un medio de cultivo universal, que está exento de sustancias inhibitoras y de indicadores, pensado para un espectro muy amplio de aplicaciones.

Este es un medio de cultivo muy útil en el muestreo del aire y recobro de microorganismos; se considera un medio de cultivo universal, ya que contiene una base nutritiva muy rica y abundante, lo cual, lo hace adecuado incluso, para el desarrollo de microorganismos exigentes.

### 3.10.- CONDICIONES GENERALES PARA LA PREPARACION Y UTILIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO

- Cuando el envase con el medio de cultivo se abra, debe cerrarse tan pronto como sea posible, ya que puede ser rehidratado accidentalmente o captar la humedad del ambiente; esto disminuye la eficiencia del medio de cultivo.

- El envase con el medio de cultivo deshidratado, debe mantenerse a temperatura ambiente en un lugar limpio y seco, distante de fuentes de calor y luz.

- Una vez que se ha rehidratado el medio de cultivo, se esterilizará a 121°C, con 21 lb de presión durante 25 minutos.

- Después de la esterilización, el medio preparado podrá ser sacado del autoclave tan pronto como haya una caída de presión hasta cero. Acelerar la apertura del autoclave antes de que la presión caiga a cero, puede ocasionar la proyección del medio fuera de su envase, y peor aún, ocasionar un accidente para quien abre el autoclave.

Ya que la temperatura del medio ha descendido a aproximadamente de 45°C - 50°C, y bajo condiciones asépticas, se retira el tapón de algodón del envase y se vierte un volumen de 50.0 mL del medio de cultivo en un vaso de precipitado, para determinar el pH. Como no está especificada la temperatura en el marbete, se realizará la determinación a 25°C +/- 2°C.

Para el agar casoy el pH debe ser de 7.3 +/- 0.1.

- Una vez verificado el pH del medio de cultivo, se adicionarán volúmenes de 10.0 mL en cajas Petri de 60 X 15 mm.

- Las placas que se preparen para este fin, deberán estar exentas de agua de condensación, para eliminarla, se colocan con el agar hacia arriba y se podrán meter 4 horas en incubadora de 30°-35°C, o bien, mantenerlas durante 16 horas a temperatura ambiente.

- Las placas se empaquetan procurando que no haya movimiento excesivo entre una y otra, y se registra el nombre del medio y la fecha de su preparación. Se conservan bajo temperatura de refrigeración.

- Del lote preparado, se conservan algunas placas para pruebas de control, que se denominan "Promoción de crecimiento". Esta prueba se realiza con cepas de colección.

La técnica se describe con detalle en el Anexo N° 3.

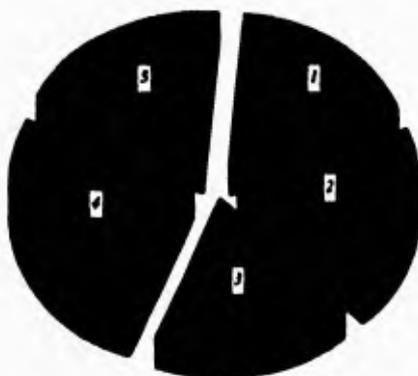
- Los medios de cultivo que se utilizan en los muestreos ambientales deben mantenerse en condiciones óptimas de humedad y temperatura de refrigeración, básicamente. Un medio de cultivo "viejo", pierde humedad y tiende a contraerse. Esta situación, incrementa la distancia entre el medio y el orificio del muestreador, por lo tanto, se forma una película sobre la superficie del agar, que retarda la velocidad de desarrollo de los microorganismos.

## RESULTADOS DEL MUESTREO AMBIENTAL

3.11.- En total, se realizaron 68 muestreos ambientales que se distribuyeron tal y como se muestra en la tabla N° 1:

Tabla N° 1: Número de muestreos realizados por área.

AREA	NUMERO DE MONITOREOS
1.-Hormonales	12
2.-Líquidos y cremas	13
3.-Ovulos y supositorios	12
4.-Sólidos	18
5.-Acondicionamiento	13



Como resultado de los 68 muestreos que se realizaron, se obtuvieron 1,205 UFC, de las cuales, un gran número se repitieron constantemente, quedando un sólo grupo, constituido por 35 colonias cuya morfología y resultado de la tinción de Gram, se exponen en la tabla N° 2:

3.12.- Tabla N° 2: CARACTERISTICAS COLONIALES

N° PROG.	MORFOLOGIA COLONIAL	GRAM
1.-	Brillante, regular, plana, color crema, suave, lisa.	Negativo.
2.-	Brillante, regular, convexa, amarilla, suave, lisa.	Positivo.
3.-	Mate, regular, convexa, color crema, suave, lisa.	Positivo.
4.-	Brillante, regular, convexa, , rosa, suave, lisa.	Negativo.
5.-	Brillante, regular, plana, , color crema, suave, lisa.	Positivo.
6.-	Mate, regular, plana, color crema, suave, lisa.	Negativo.
7.-	Brillante, regular, plana, amarilla, suave, lisa.	Negativo.
8.-	Brillante, regular, convexa, , color crema, suave, lisa.	Negativo.
9.-	Mate, irregular, plana, , color crema, dura, rugosa.	Positivo.
10.-	Poco brillante, regular, convexa, blanca, suave, lisa.	Positivo.
11.-	Mate, regular, plana, blanca, suave, lisa.	Positivo.
12.-	Brillante, regular, convexa, beige, suave, lisa.	Negativo.
13.-	Brillante, irregular, convexa, beige, suave, granular.	Negativo.
14.-	Brillante, regular, convexa, beige oscuro, suave, lisa.	Positivo.
15.-	Brillante, regular, ligeramente convexa, centro beige y contorno blanco, suave, lisa.	Levadura.
16.-	Brillante, regular, convexa, blanca, suave, lisa.	Negativo.
17.-	Ligeramente mate, irregular, umbonada, beige oscuro, suave, lisa.	Positivo.
18.-	Mate, regular, umbonada, color crema, suave, lisa.	Positivo.
19.-	Brillante, irregular, convexa, color crema, centro oscuro, halo café, suave, granular.	Negativo.
20.-	Brillante, regular, convexa, ligeramente café, suave, lisa.	Positivo.
21.-	Muy brillante, regular, plana, beige y centro ligeramente rosa, suave, lisa.	Positivo.
22.-	Brillante, irregular, plana, color crema, suave, lisa.	Positivo.
23.-	Brillante, regular, umbonada, color naranja, suave, ligeramente granular.	Negativo.
24.-	Brillante, regular, convexa con forma de gota, amarillo claro, suave, lisa.	Positivo.
25.-	Brillante, regular, plana, blanca, suave, lisa.	Positivo.
26.-	Brillante, irregular, umbonada, beige, suave, lisa.	Negativo.
27.-	Mate, regular, convexa, amarilla, suave, lisa.	Positivo.
28.-	Brillante, regular, plana, amarilla, suave, lisa.	Positivo.
29.-	Brillante, irregular, plana, color crema, centro blanco, suave, lisa.	Negativo.
30.-	Brillante, regular, convexa, verde-grisácea, suave, lisa.	Negativo.
31.-	Mate, irregular, plana, rosa, suave, lisa.	Positivo.
32.-	Mate, regular, plana, café oscuro, dura, lisa.	Positivo.
33.-	Mate, regular, convexa, café, suave, lisa.	Levadura.
34.-	Mate, irregular, convexa, blanca, suave, lisa.	Positivo.
35.-	Mate, regular, plana, beige, suave, lisa.	Negativo.

Los resultados cuantitativos de los muestreos, se pueden observar en las tablas N° 3 y 4.

TABLA N° 3

3.13 RESULTADOS CUANTITATIVOS

COLONIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
HORMONALES	8	36	3	15	6	9	6	8	5	5	3	0	5	14	5
LIQUIDOS Y CREMAS	2	18	2	6	6	2	6	5	11	6	2	3	6	5	6
OVULOS Y SUPOSITORIOS	2	3	0	5	3	0	8	2	3	5	0	2	2	0	0
SOLIDOS	8	14	5	11	11	8	8	3	20	6	3	3	3	2	2
TOTAL	20	71	10	37	28	19	28	18	39	22	8	8	18	21	13

COLONIA	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
HORMONALES	0	17	14	17	5	6	12	20	2	14	2	2	2	18	3	0	2	2	2	5
LIQUIDOS Y CREMAS	2	2	0	2	0	2	11	0	18	8	9	3	0	2	0	0	0	4	2	2
OVULOS Y SUPOSITORIOS	0	2	0	0	0	0	5	0	0	0	2	1	0	3	0	0	0	7	3	3
SOLIDOS	6	2	2	3	0	5	11	2	8	2	5	0	8	0	2	2	3	0	2	0
TOTAL	8	23	19	22	6	13	39	22	28	24	18	6	8	23	6	2	6	13	8	10

TABLA N° 4  
RESULTADOS CUANTITATIVOS

COLONIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ACONDICIONAMIENTO	20	12	21	27	18	20	20	23	23	11	8	8	8	17	18

COLONIA	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
ACONDICIONAMIENTO	18	8	11	15	14	6	77	17	36	21	12	9	6	0	11	9	6	8	18	23	

Ahora bien, en lo que corresponde a las identificaciones bioquímicas, se fueron realizando conforme se iban aislando los microorganismos.  
Los resultados se han agrupado en la tabla N° 5 de identificaciones bioquímicas de los 35 microorganismos aislados, obtenidos después de los muestreos ambientales.

3.14.- Tabla N° 5: IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

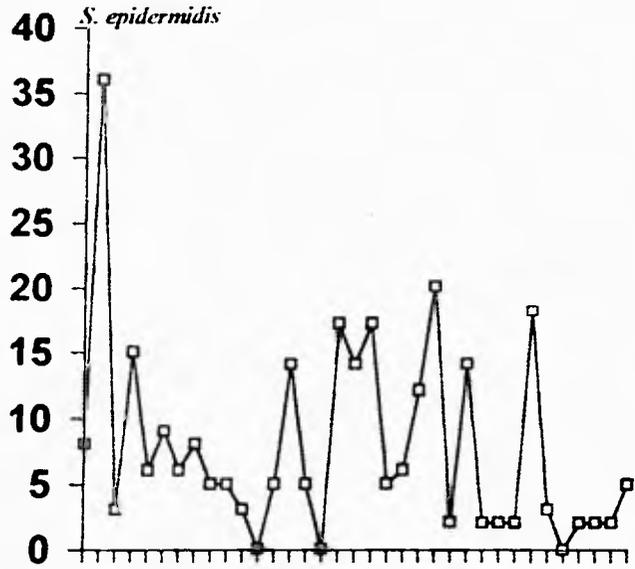
N° PROG.	IDENTIFICACION	OBSERVACIONES
1.-	<i>Pseudomonas spp.</i>	Buena probabilidad pero baja selectividad.
2.-	<i>S. epidermidis</i>	Buena identificación.
3.-	<i>S. hominis</i>	Buena probabilidad pero baja selectividad.
4.-	<i>S. marcescens</i>	Muy buena identificación.
5.-	<i>B. circulans</i>	Buena probabilidad.

Nº PROG.	IDENTIFICACION	OBSERVACIONES
6.-	<i>E. durans</i>	Excelente identificación.
7.-	<i>Ps. maltophila</i>	Muy buena identificación.
8.-	<i>Ps. paucimobilis</i>	Muy buena identificación.
9.-	<i>C. xerosis</i>	Buena probabilidad.
10.-	<i>A. calco var. lwoffi</i>	Excelente identificación.
11.-	<i>B. subtilis</i>	Buena probabilidad.
12.-	<i>Ps. aeruginosa</i>	Muy buena identificación.
13.-	<i>Pseudomonas spp 1/30</i>	Muy buena identificación.
14.-	<i>Cocos grupa 11-F</i>	Muy buena identificación.
15.-	<i>Rhodotorula rubra</i>	Buena probabilidad.
16.-	<i>Ps. pseudomallei</i>	Excelente identificación.
17.-	<i>S. epidermidis 1:45</i>	Buena identificación.
18.-	<i>B. cereus</i>	Buena probabilidad.
19.-	<i>Ps. pseudomallei</i>	Identificación presuntiva.
20.-	<i>S. capitis</i>	Buena identificación.
21.-	<i>B. megaterium</i>	Buena probabilidad.
22.-	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	Buena probabilidad.
23.-	<i>E. coli</i>	Excelente identificación.
24.-	<i>S. aureus</i>	Excelente identificación.
25.-	<i>S. hominis 1/1569</i>	Buena probabilidad pero baja selectividad.
26.-	<i>E. agglomerans</i>	Buena probabilidad pero baja selectividad.
27.-	<i>S. intermed</i>	Excelente identificación.
28.-	<i>B. sphaericus</i>	Buena probabilidad.
29.-	<i>Ps. pseudomallei 1:77</i>	Buena probabilidad pero baja selectividad.
30.-	<i>Moraxella spp</i>	Buena identificación.
31.-	<i>B. sphaericus</i>	Buena probabilidad.
32.-	<i>S. simulans</i>	Buena probabilidad pero baja selectividad.
33.-	<i>Torulopsis candida</i>	Buena probabilidad.
34.-	<i>S. haemolyticus</i>	Buena identificación.
35.-	<i>Alcaligenes spp</i>	Buena identificación.

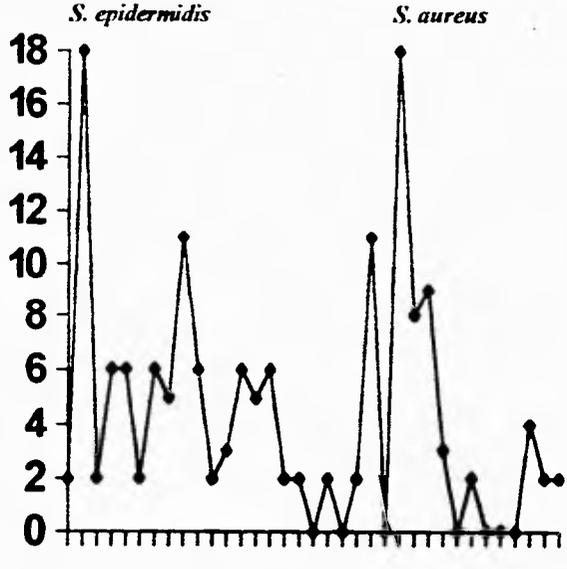
En base a los resultados cuantitativos se estableció la frecuencia de aislamientos microbianos por área de muestreo. Ver gráficas N° 2, 3, 4, 5 y 6.

Como se puede observar en dichas gráficas, los aislamientos más comunes son:

**RESULTADOS CUANTITATIVOS DEL MUESTREO**

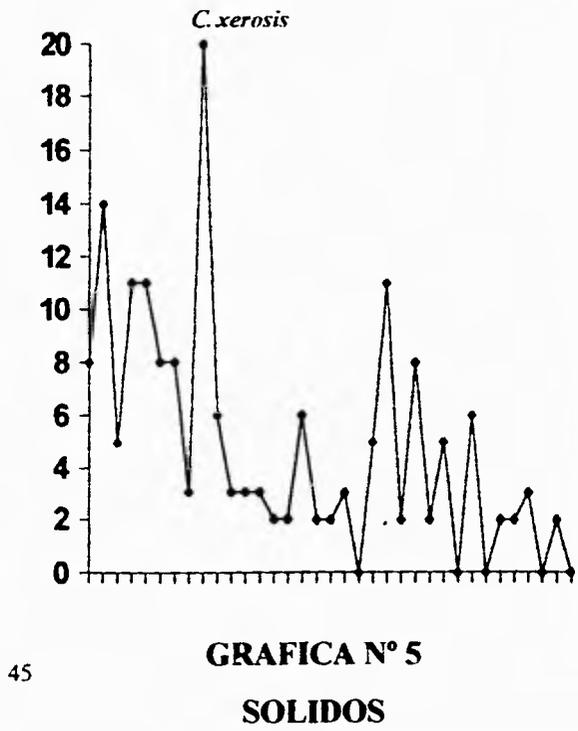
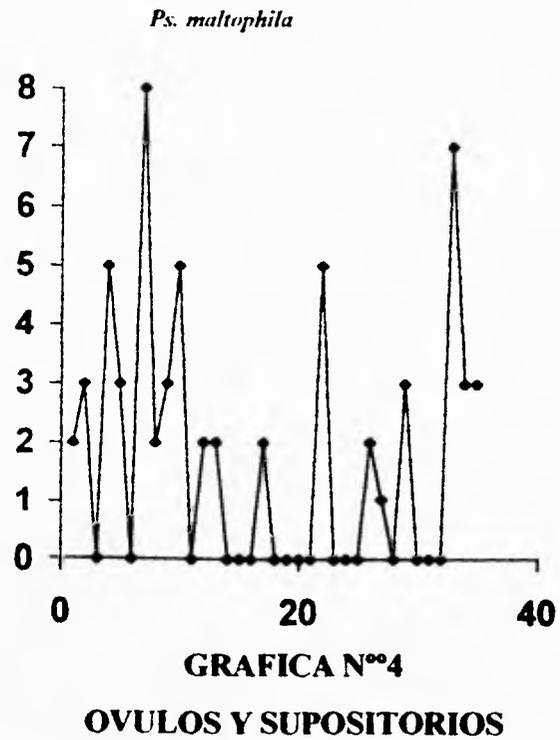


**GRAFICA N° 2  
HORMONALES**

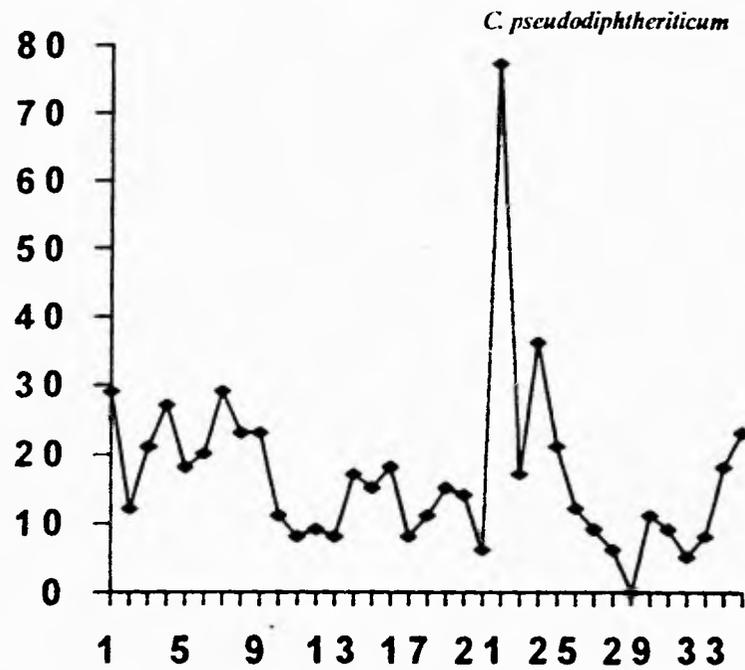


**GRAFICA N° 3  
LIQUIDOS Y CREMAS**

**RESULTADOS CUANTITATIVOS DEL MUESTREO**



## RESULTADOS CUANTITATIVOS DEL MUESTREO



GRAFICA N° 6  
ACONDICIONAMIENTO

### 3.15.- AISLAMIENTOS POR AREA

AREA	MICROORGANISMOS
Hormonales	<i>sS. epidermidis</i>
Líquidos y cremas	<i>sS. epidermidis</i> y <i>sS. aureus</i>
Ovulos y supositorios	<i>sPs. maltophila</i>
Sólidos	<i>sC. xerosis</i>
Acondicionamiento	<i>sC. pseudodiphtheriticum</i>

- 1.- *Staphylococcus epidermidis*
- 2.- *Staphylococcus epidermidis*
- 3.- *Staphylococcus aureus*
- 4.- *Pseudomonas maltophila*
- 5.- *Corynebacterium xerosis*
- 6.- *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

### 3.16.- CRITERIOS CONSIDERADOS PARA ESTABLECER ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS

Ahora bien, con los resultados obtenidos, tanto cuantitativos como cualitativos, se establecerán límites microbiológicos que proporcionen rangos de seguridad y un sistema que alerte con tiempo y pernita, oportunamente, tomar acciones correctivas.

El programa de control microbiológico, está en posibilidades de establecer niveles normales, niveles de alerta y niveles de acción, para cada una de las áreas muestreadas, utilizando las ecuaciones siguientes:

$$UCL = X + A2R$$

$$LCL = X - A2R$$

$$ST D = R/d2$$

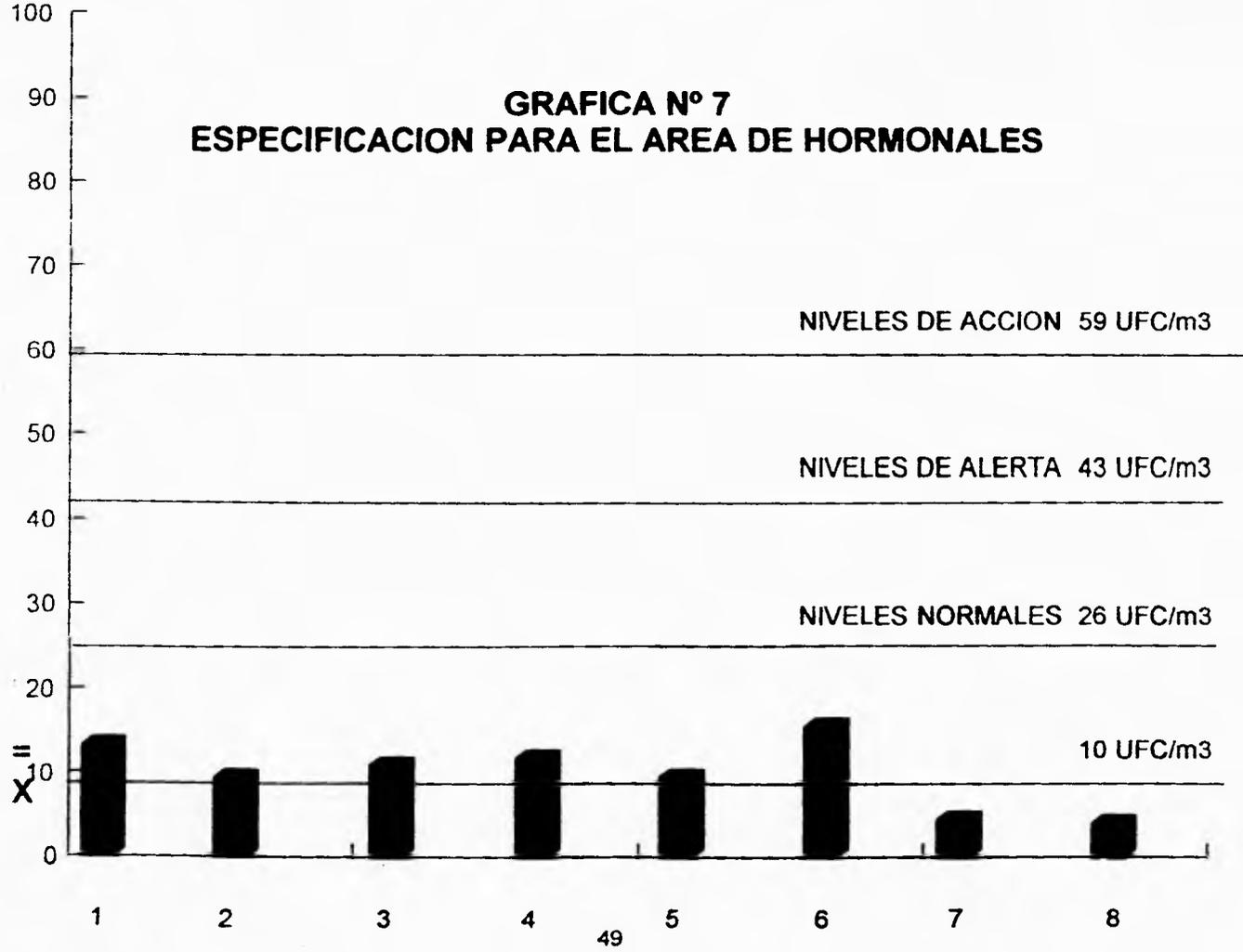
**3.16.- ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS POR ÁREA DE MUESTREO.**

AREA	= X	NIVELES NORMALES	NIVELES DE ALERTA	NIVELES DE ACCION
<b>HORMONALES</b>	10 UFC/m <sup>3</sup>	26 UFC/m <sup>3</sup>	43 UFC/m <sup>3</sup>	59 UFC/m <sup>3</sup>
<b>LIQUIDOS Y CREMAS</b>	10 UFC/m <sup>3</sup>	33 UFC/m <sup>3</sup>	57 UFC/m <sup>3</sup>	81 UFC/m <sup>3</sup>
<b>OVULOS Y SUPOSITORIOS</b>	11 UFC/m <sup>3</sup>	31 UFC/m <sup>3</sup>	52 UFC/m <sup>3</sup>	73 UFC/m <sup>3</sup>
<b>SOLIDOS</b>	10 UFC/m <sup>3</sup>	39 UFC/m <sup>3</sup>	69 UFC/m <sup>3</sup>	99 UFC/m <sup>3</sup>
<b>ACONDICIONAMIENTO</b>	10 UFC/m <sup>3</sup>	21 UFC/m <sup>3</sup>	33 UFC/m <sup>3</sup>	44 UFC/m <sup>3</sup>

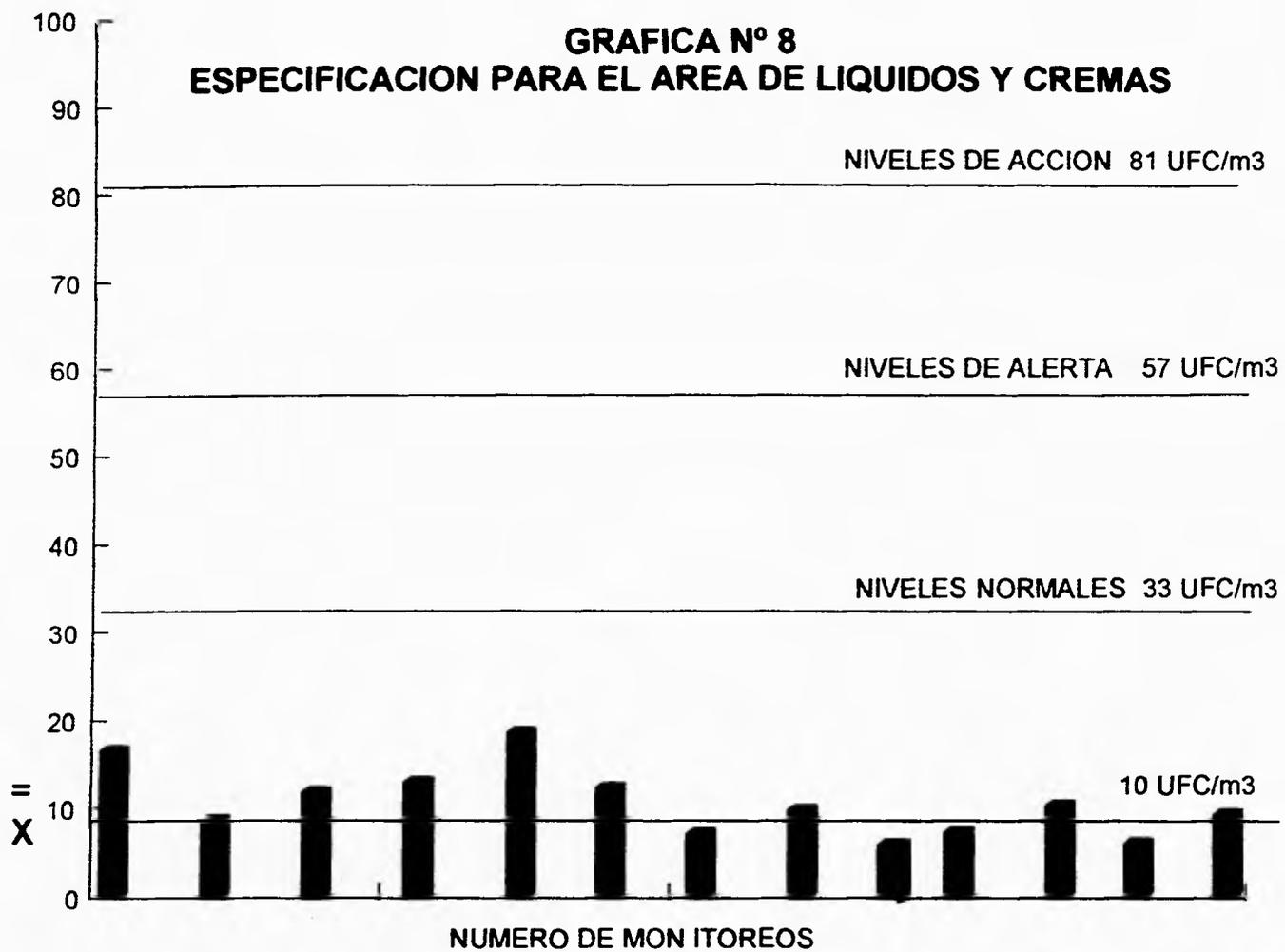
Gráficamente, se pueden observar los resultados estadísticos de los muestreos ambientales de cada uno de los cuartos, de cada una de las áreas comprendidas en el programa de control microbiológico. Ver gráficas N° 7, 8, 9, 10 y 11.

Los cálculos que permiten obtener los resultados anteriores se describen en el Anexo N° 4.

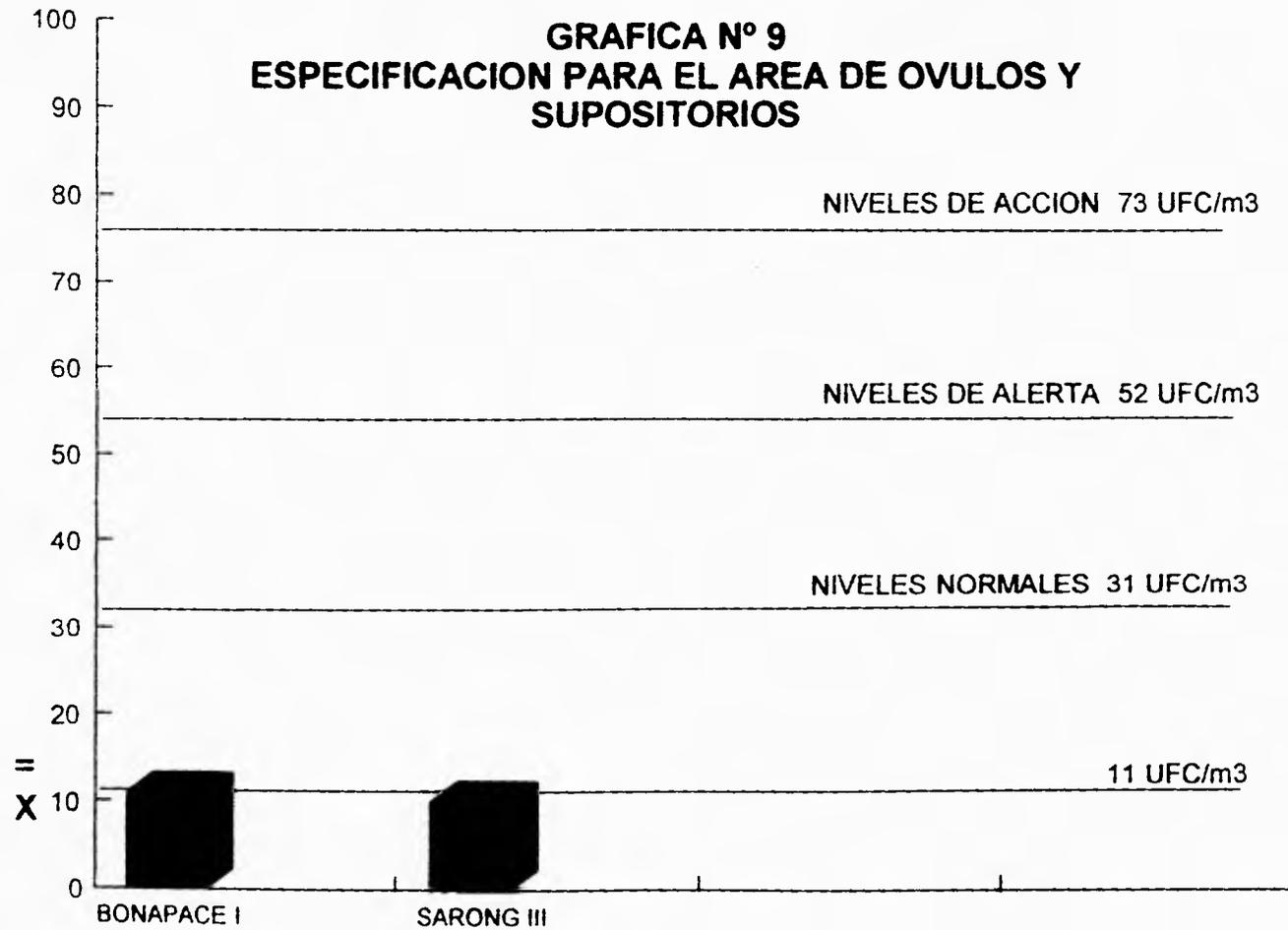
**GRAFICA N° 7**  
**ESPECIFICACION PARA EL AREA DE HORMONALES**

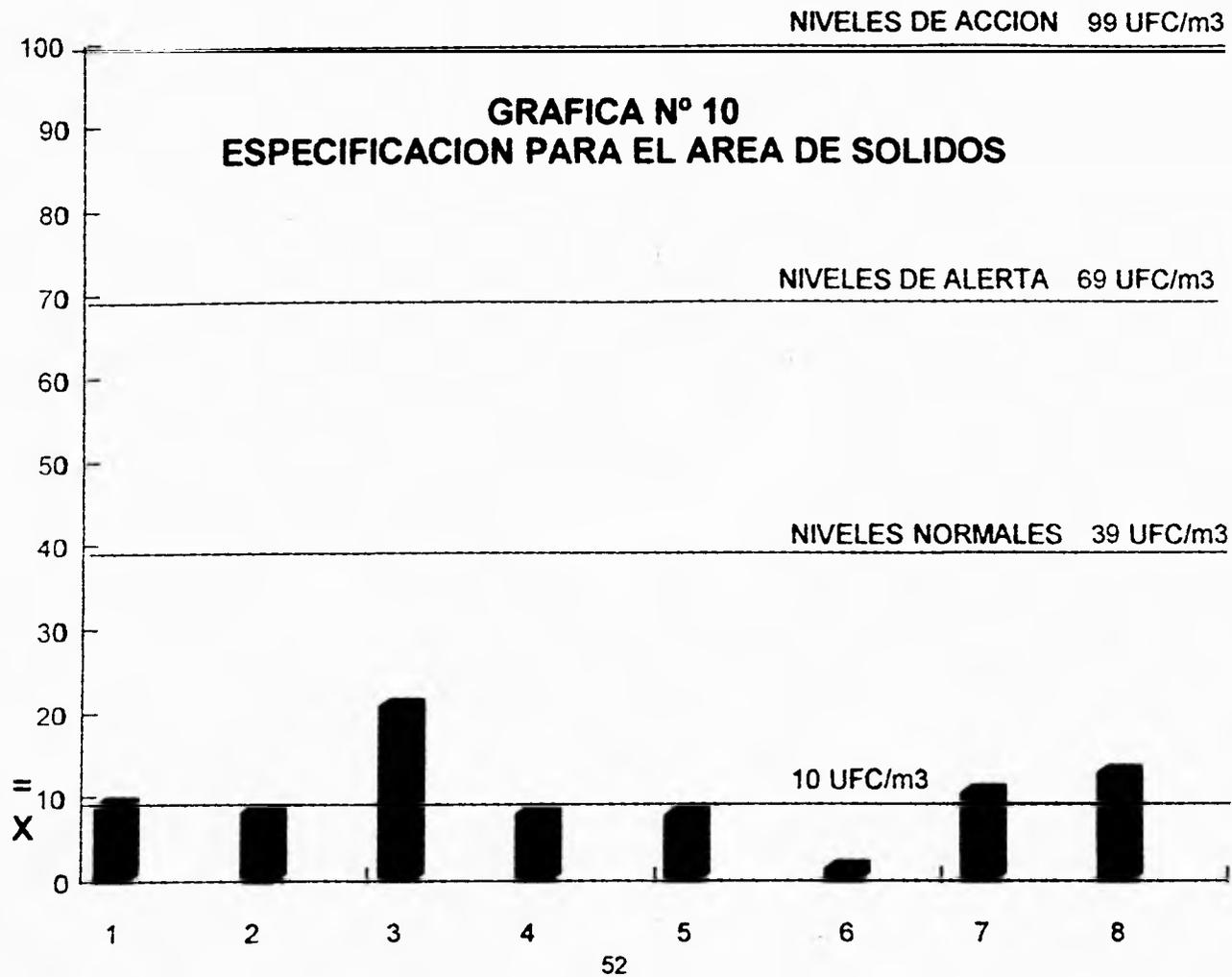


# GRAFICA N° 8 ESPECIFICACION PARA EL AREA DE LIQUIDOS Y CREMAS

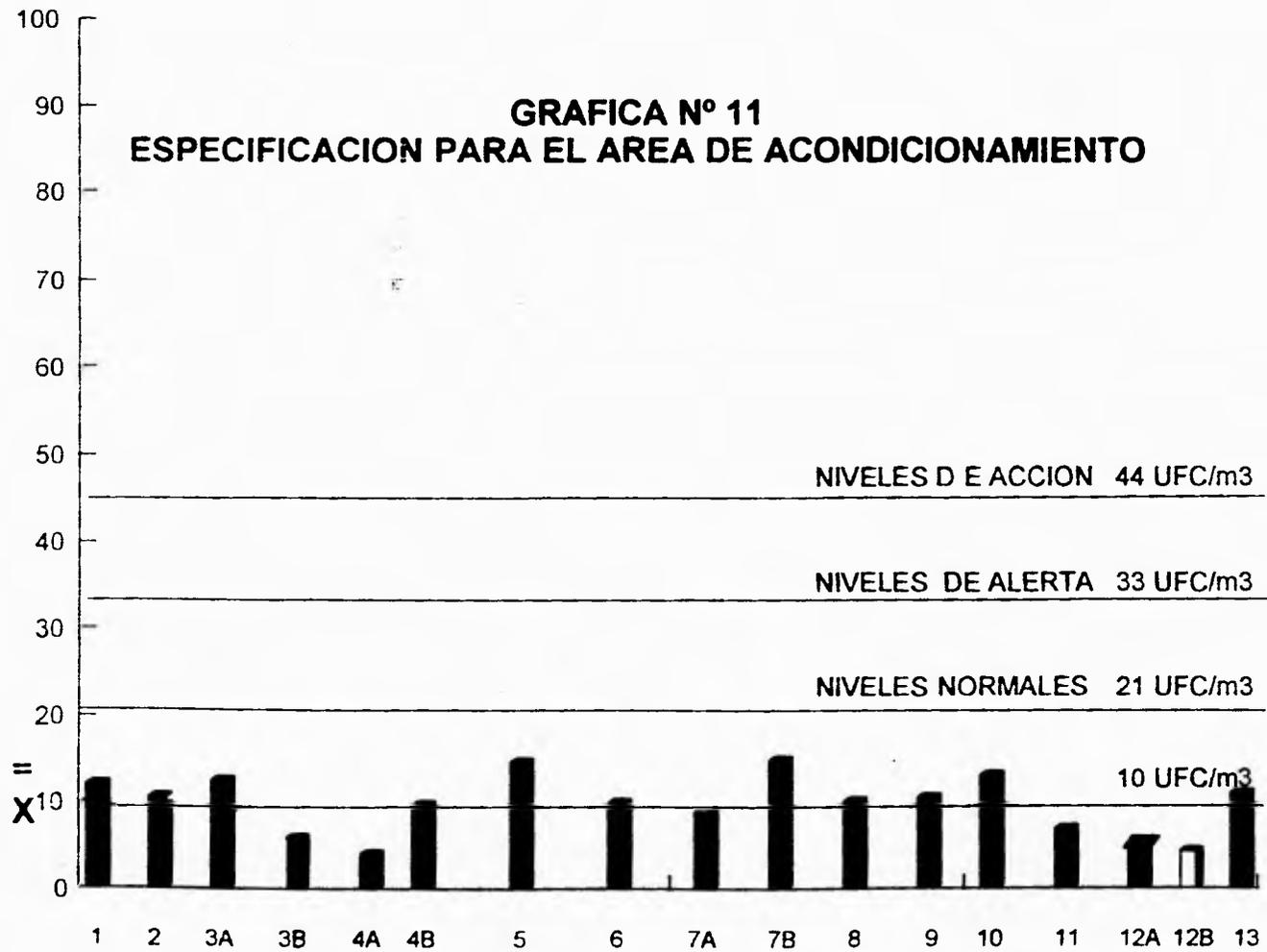


### GRAFICA N° 9 ESPECIFICACION PARA EL AREA DE OVULOS Y SUPOSITORIOS

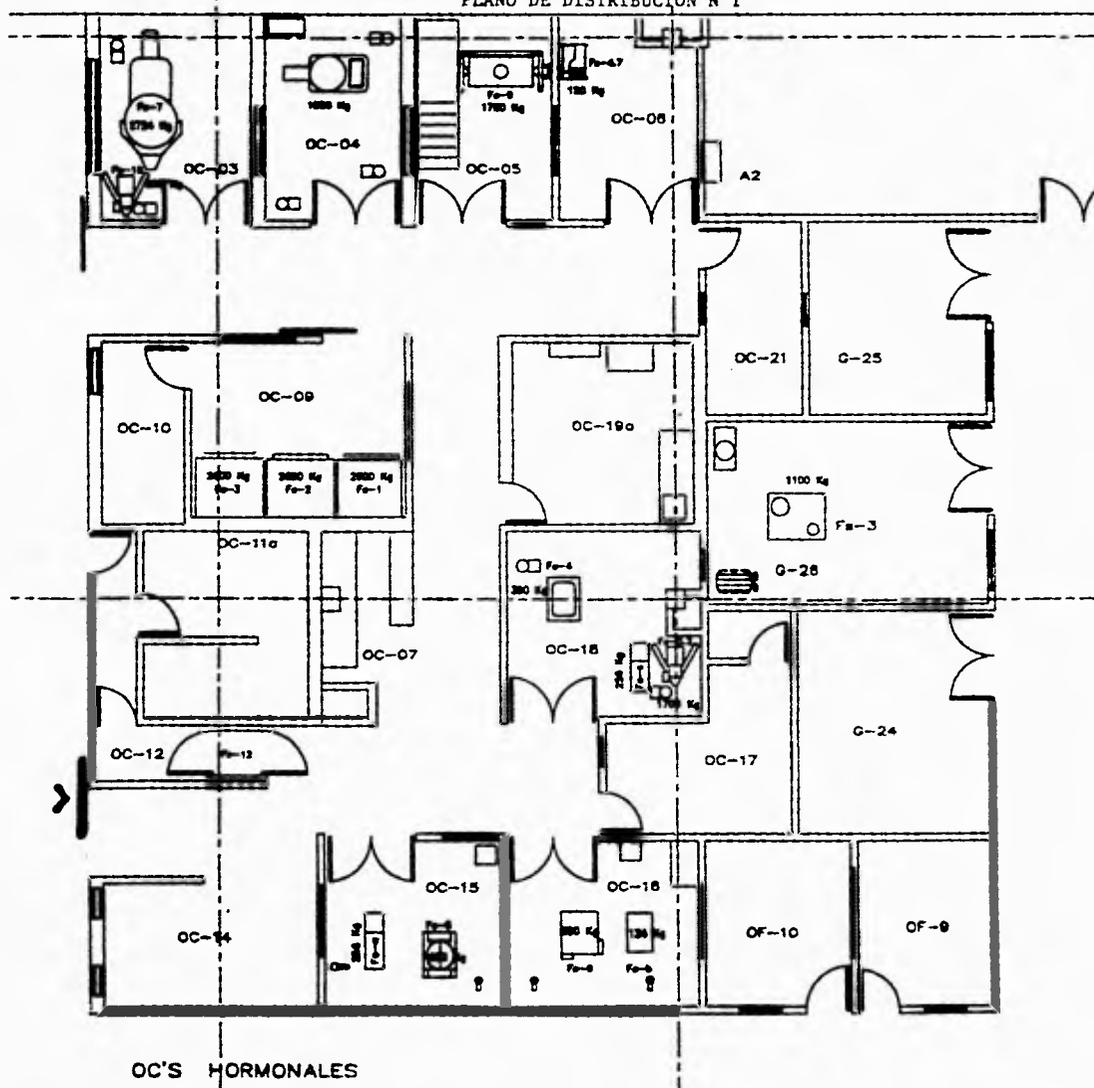




**GRAFICA N° 11**  
**ESPECIFICACION PARA EL AREA DE ACONDICIONAMIENTO**

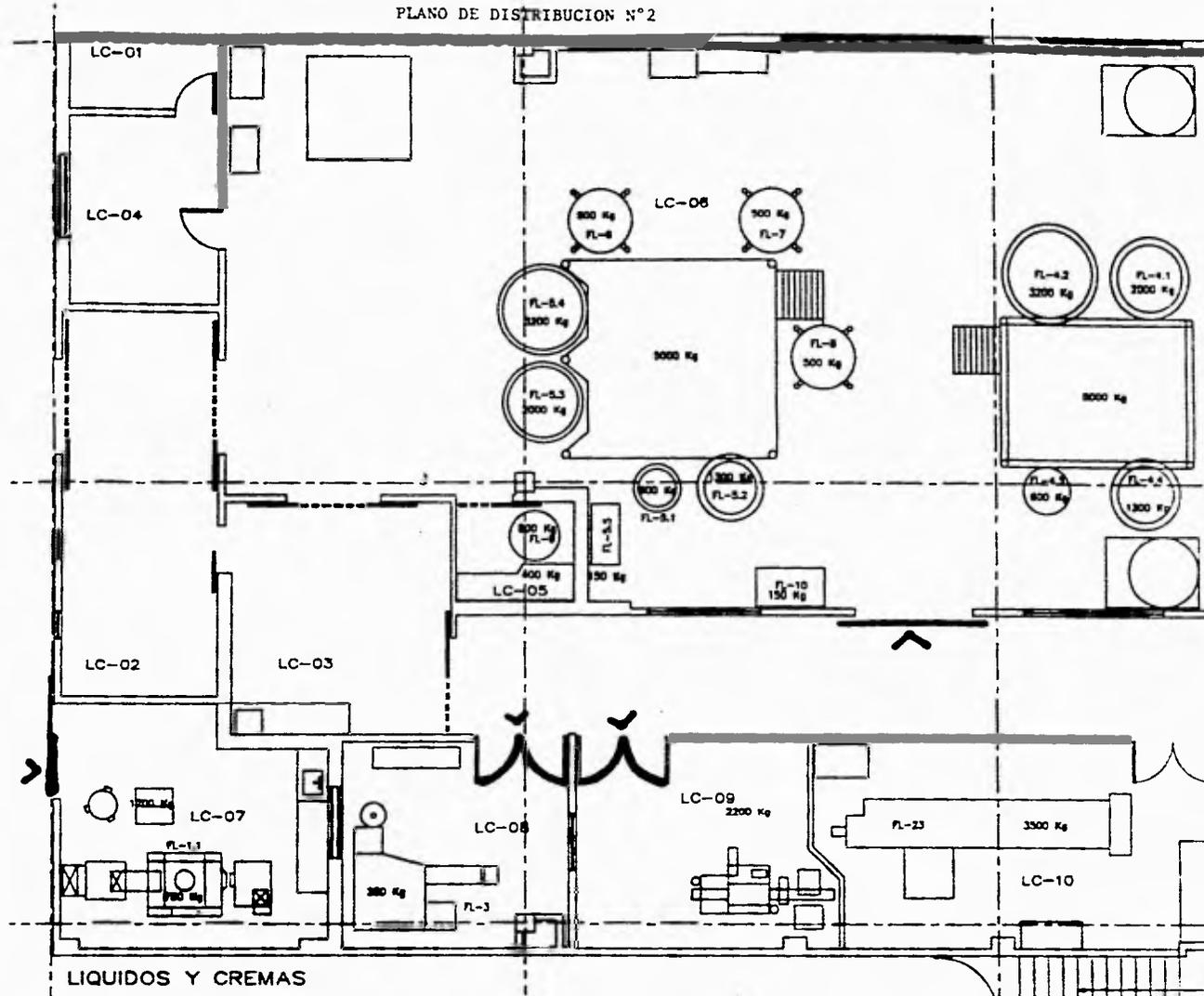


PLANO DE DISTRIBUCION N°1

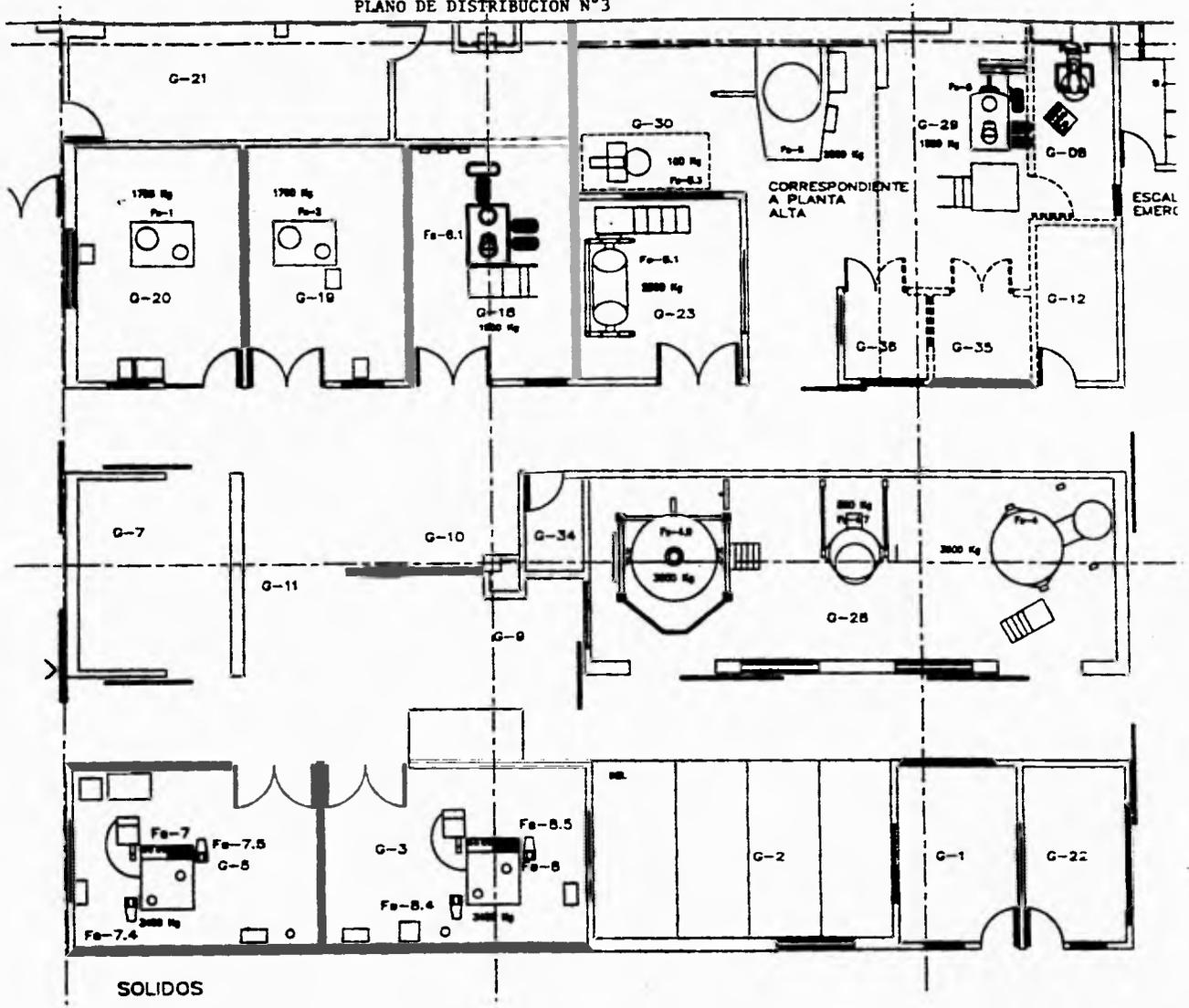


OC'S HORMONALES

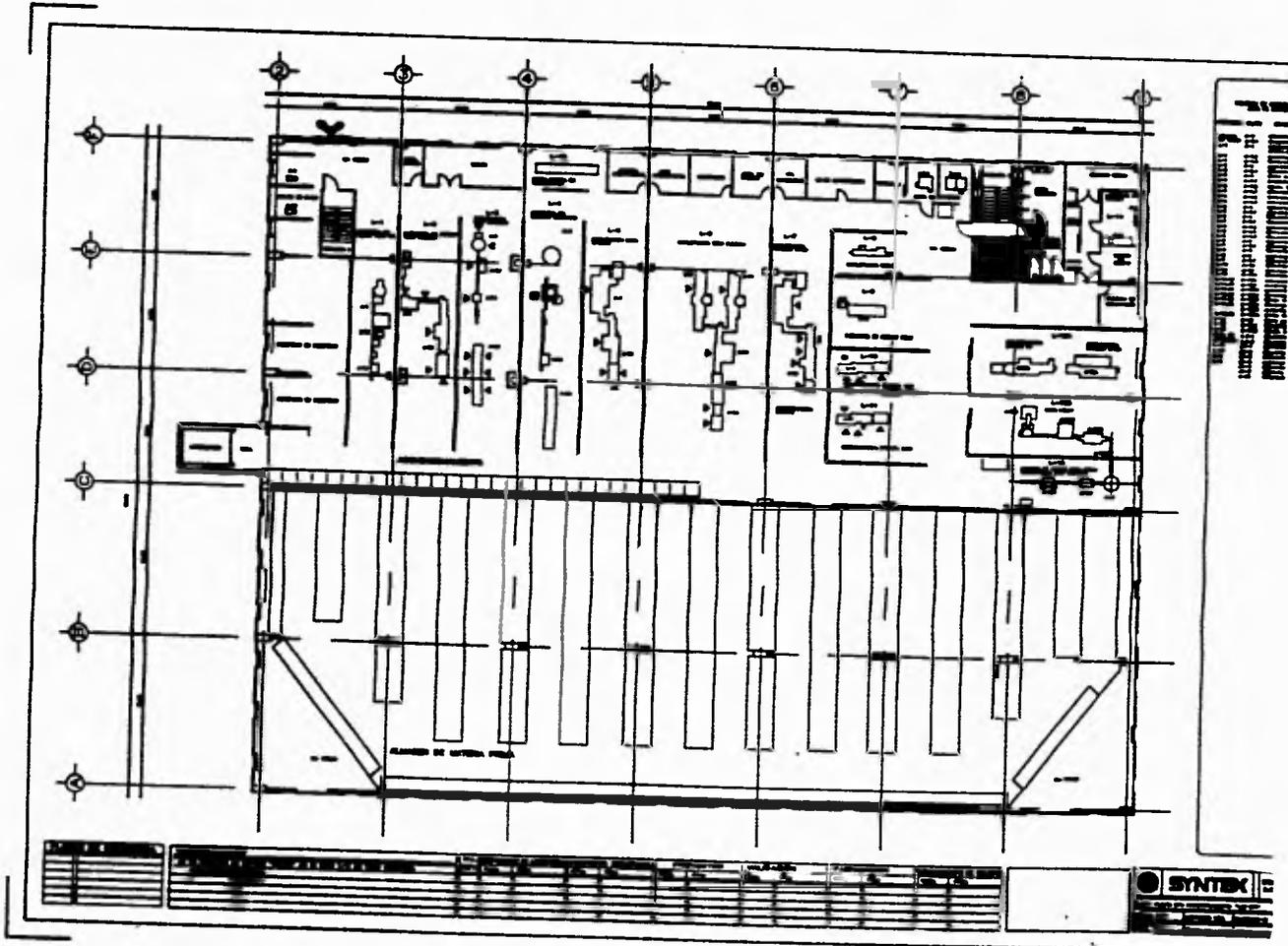
PLANO DE DISTRIBUCION N° 2



PLANO DE DISTRIBUCION N°3



PLANO DE DISTRIBUCION N°4



**DISCUSION DE  
RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

## DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Considerando el tipo de contaminantes que se buscaban, era indispensable un equipo que fuera suficientemente capaz de detectar microorganismos, que, mediante medios pasivos como la exposición de placa, por ejemplo, no se hubieran recobrado con la velocidad dada por un método activo, como fue el impactador de aire; que en este caso, fue un S.A.S. Compact.

Se observó que la reproducibilidad de los datos obtenidos de los muestreos con este equipo, es muy buena, y más aún, la capacidad que tiene para recobrar microorganismos de interés.

Las tablas de resultados cuantitativos, tanto de la sección de fabricación como de la sección de acondicionamiento, se manejaron separadamente, ya que las condiciones de trabajo en acondicionamiento son diferentes, comenzando por el número de personas que tienen acceso, los materiales con que se trabaja, el transporte de materias primas, envases y productos empacados, listos para embarque, etc..

Los resultados estadísticos de los muestreos, permiten establecer especificaciones ambientales microbiológicas para cada una de las áreas que comprenden las secciones de fabricación y acondicionamiento.

Dichas especificaciones muestran que, el ambiente muestreado antes, durante y después del proceso de manufactura o acondicionamiento, se encuentra bajo control.

En base a la especificación ambiental microbiológica, para la sección de acondicionamiento, se recomienda un control más estricto en cuanto al número de personas que tienen acceso a ella, por ejemplo, y otras variables, ya que es la que podría presentar alguna alteración estadística.

La información gráfica, indica que, todos los microorganismos aislados más frecuentemente, han tenido como fuente principal de origen al hombre.

*S. epidermidis* es flora residente en el hombre, se encuentra habitualmente en la piel, la conjuntiva ocular, en vías respiratorias altas y en vagina. Puede resultar patógeno aunque es poco frecuente.

A diferencia de *S. aureus*, que se considera flora transitoria en el hombre y francamente patógeno, originando un gran número de padecimientos.

Lo anterior conlleva a pensar en el estado de salud de los operarios y demás personas que están relacionadas con los procesos de fabricación en sus diferentes etapas. Si realmente es personal con alguna patología aparente o se trata de portadores sanos.

Por su parte, *C. xerosis*, también es flora residente en el hombre, se encuentra habitualmente en la piel, en conjuntiva ocular, vías respiratorias altas y en vagina.

Es una de las tres especies más importantes del género *Corynebacterium* y se considera no patógeno.

Finalmente, *C. pseudodiphtheriticum* no se considera flora residente, aunque puede encontrarse con cierta regularidad en la cavidad oral. Es no patógeno.

Dentro del laboratorio de control de calidad microbiológica, se realizan pruebas de presencia de microorganismos patógenos (*S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* y *S. typhimurium*), y de número más probable (NMP), para los productos manufacturados, y los resultados que se obtienen son satisfactorios, lo que lleva a concluir que:

- el ambiente de producción está bien controlado
- que aunque se detecten cantidades determinadas de microorganismos en el ambiente, los ingredientes de la formulación, pueden resultar bacteriostáticos o bactericidas, inhibiendo el desarrollo y reproducción de los microorganismos.

**ANEXOS**

**ANEXO N° 1**  
**METODO DE MUESTREO**

**USO DEL SAS COMPACT**

**I.-OPERACION PRELIMINAR**

- 1.1.- **Quitar la cubierta del muestreador y limpiarla, con un algodón humedecido con algún agente desinfectante ( preferentemente algún alcohol), la parte interna y externa de la misma.**
- 1.2.- **Colocar la cubierta en el muestreador.**
- 1.3.- **El interruptor principal debe ser colocado en la posición "on".**
- 1.4.- **Observar que el foco de la batería se mantenga prendido una vez que se ha transferido a la posición "on". (Si el foco se prende y apaga, se debe cargar la batería).**
- 1.5.- **Seleccionar una unidad de monitoreo.**
- 1.6.- **Presionar el botón de "start" colocado en el panel de control del aparato, el motor se para automáticamente al final del ciclo (1 unidad equivale aproximadamente a 20 segundos).**

**El procedimiento anterior debe seguirse con la finalidad de verificar que las unidades en las que está programado el equipo funcionan correctamente.**

**II.- OPERACION**

- 2.1.- **Quitar la cubierta del muestreador, tomándola por los bordes, evitando tocar la parte interna y externa de la zona perforada.**
- 2.2.- **Insertar la placa en la ranura de retención del aparato sin retirar la tapa de la placa que contiene el medio de cultivo; una vez fija la caja se elimina la tapa.**
- 2.3.- **Colocar nuevamente la cubierta en el muestreador.**
- 2.4.- **Activar el interruptor principal colocándolo en la posición "on".**
- 2.5.- **Observar que el foco de la batería se mantenga prendido una vez que se ha transferido a la posición "on".**
- 2.6.- **Seleccionar las unidades de aspiración requeridas, considerando que una unidad de muestreo aspira 30 L de aire.**

El distribuidor del equipo sugiere que:

- se seleccionen de 1-6 unidades (30 L/180 L), para áreas contaminadas.
  - de 9-11 unidades (270 L/330 L), para áreas limpias.
  - de 13-15 unidades (390 L/450 L) para el monitoreo de áreas asépticas.
- En nuestro caso, se seleccionaron 9 unidades de monitoreo con equipo S.A.S. Compact.

- 2.7.- Presionar el botón de "start".
- 2.8.- Dividir la zona a monitorear en cuatro puntos imaginarios y dirigir el aparato hacia dichos puntos, con movimiento de ida y vuelta y de arriba a abajo, lentamente, esto último se hace con la intención de evitar, en lo posible, turbulencias.
- 2.9.- Al final del ciclo, transferir la posición del interruptor principal a la posición "off". El foco de la batería debe apagarse.
- 2.10.- Retirar la cubierta del equipo y cubrir la placa, una vez que se ha sujetado bien tanto la tapa como la placa, se debe sacar del equipo.
- 2.11.- Incubar las placas a una temperatura de 35°-37°C, durante 18-24 horas.
- 2.12.- Al término del período de incubación, contar el número de unidades formadoras de colonia de cada placa, y relacionarla con el número obtenido por unidad de flujo de aire.
- 2.13.- El número de unidades formadoras de colonias por m<sup>3</sup>, se calcula a partir de la fórmula:

$$X = \frac{\text{N}^\circ \text{ UFC en la placa} \times 1000}{\text{N}^\circ \text{ L de aire muestreados}}$$

Donde:

$$X = \text{Número más probable de UFC/m}^3$$

## **MATERIALES**

Para realizar los monitoreos ambientales se requiere:

- Equipo S.A.S. Compact (Surface Air System)
- Placas con agar nutritivo.

## ANEXO N° 2 METODO DE IDENTIFICACION

La segunda etapa que se abordará, será la identificación de microorganismos recobrados en el monitoreo ambiental, ésta es una parte muy importante del programa de monitoreo, ya que no basta conocer el nivel cuantitativo microbiológico del área, es necesario saber si se trata de aislamientos comunes que sean indicativos de resistencia bacteriana a algún agente desinfectante, cambios en la flora residente, o bien, la introducción de especies no detectadas que pudieran afectar adversamente la calidad del producto; razón por la cual, se consideró necesario cualificar la población microbiana de las áreas en que se fabrican fármacos no estériles.

Con respecto a la identificación de los microorganismos recobrados a partir del monitoreo, se hizo una selección de dichos especímenes y se agruparon en 35 aislamientos a identificar bioquímicamente. Esta selección se hizo en base a las características macroscópicas y microscópicas de los organismos.

La identificación se realizó utilizando el sistema API-20. Se usó el API-20E para identificar bacilos gramnegativos, el API-20GP para cocos grampositivos y el API-20C para identificar hongos y levaduras. La identificación de los bacilos grampositivos se realizó usando pruebas bioquímicas convencionales, ya que no se cuenta con el equipo comercial.

A continuación se describirá el uso del sistema API (Analytical Profile Index).

### ACTIVIDADES GENERALES

#### A) COLECCION DE ESPECIMENES Y PREPARACION

Independientemente de su origen, los especímenes deben ser transportados al laboratorio inmediatamente después de su colección, y procesarlos tan pronto como sea posible. Los especímenes deben sembrarse en agar nutritivo por la técnica de agotamiento de asa, hasta completar tres pases, con una temperatura de incubación de 35°-37°C y no más de 24 horas entre cada pase.

En el caso de hongos y levaduras, éstos se deben sembrar en agar papa glucosa (PDA), y completar los tres pases a temperatura de incubación (35°-37°C) El tiempo varía de 48-

**72 horas, dependiendo del desarrollo que se obtenga.**

#### **B) PREPARACION DEL SISTEMA**

**Distribuir de 5.0-10.0 ml de agua en la tira soporte, con la finalidad de proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.**

**Sacar la tira reactiva de la bolsa y colocarla en la tira soporte. En el caso del sistema API-20GP, la tira debe deslizarse y sostenerla con el clip.**

#### **C) PREPARACION DEL INOCULO**

**Con un aplicador de madera estéril, tocar una colonia, o bien, un número de colonias similares en el caso de que éstas sean muy pequeñas (menores a 1.0 mm de diámetro). Suspender las colonias en 5.0 ml de SSI 0.85% estéril (pH 5.5-7.0), o bien, en última instancia, agua destilada estéril. El contenido debe mezclarse cuidadosamente. El inóculo debe ser usado dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación.**

#### **I.- INOCULACION DEL SISTEMA API-20E**

##### **(UTIL EN LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS)**

**Las tiras API-20E, contienen 20 microtubos, cada uno de los cuales está contituido por un tubo y una pequeña cúpula.**

**Introducir una pipeta Pasteur en el tubo que contiene la suspensión.**

**Inclinar la tira soporte y llenar el tubo de los microtubos, colocando la punta de la pipeta a un lado de la cúpula, sin tocar el interior de esta.**

**NOTA: Las reacciones ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y UREA, pueden ser mejor interpretadas si los microtubos se llenan ligeramente.**

**En el caso de los tubos CIT, VP y GEL, se deberá inocular tanto el tubo como la cúpula.**

**Después de la inoculación, se deberá llenar completamente, con aceite mineral, la sección de la cúpula de los tubos ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y UREA.**

**Resembrar en agar casoy el exceso de suspensión bacteriana, con la finalidad de verificar su pureza y para realizar pruebas requeridas, como la oxidasa, serológicas y/o para pruebas bioquímicas adicionales. Estas placas deben incubarse de 18-24 horas a 35°-37°C.**

## **INCUBACION DE LAS TIRAS**

Después de la inoculación, colocar la tapa plástica sobre la tira soporte, e incubar de 18-24 horas a 35°-37°C.

Las reacciones bioquímicas en el sistema API-20E, deben ser leídas después de 18-24 horas de incubación.

## **LECTURA DE LAS TIRAS**

Después de 18 horas y antes de 24 horas de incubación, se deben registrar todas las reacciones que no requieran de la adición de reactivos.

Si el tubo de la GLUCOSA es negativo (azul o verde), no adicionar ningún reactivo e incubar de 18-24 horas más.

En este caso, se deben realizar pruebas suplementarias para determinar el tipo de metabolismo del microorganismo (oxidativo o fermentativo). Para ello es necesario resembrar por picadura en un medio con glucosa (OF), en el medio (GI), para observar su movilidad y, en agar MacConkey. La muestra requerida para la resiembra se toma del cultivo obtenido después de la resiembra del exceso de suspensión bacteriana.

Después del periodo de incubación indicado, adicionar los reactivos que se requieran, independientemente de que se observen cambios evidentes o no.

Si el tubo de la GLUCOSA es positivo (amarillo):

a) realizar la prueba de la oxidasa; del desarrollo obtenido a partir del exceso de suspensión bacteriana, se toma con asa estéril, una colonia aislada, aunque puede emplearse también una suspensión densa de la colonia aislada.

Con el asa se distribuye bien la colonia, o la suspensión bacteriana, sobre la superficie de la zona reactiva de una varilla de Bactident Oxidasa.

Al cabo de 20-60 segundos, se compara el color desarrollado en la zona reactiva con la escala cromática impresa en el envase. La prueba se considera positiva cuando se observa una coloración que puede ir del azul al azul-violeta, y negativa cuando no se observa dicha coloración. En el intervalo de las reacciones negativas, es posible apreciar una coloración crema, amarilla muy tenue o bien, puede no observarse ningún cambio de color en la superficie de la zona reactiva.

Las varillas reactivas contienen una mezcla de N-N dimetil-1,4-fenilendiamina-1-naftol, que al reaccionar con el sistema citocromo/citocromo C oxidasa, produce un complejo azul-azul violeta (azul de indofenol). Esta reacción se lleva a cabo en presencia de

oxígeno.

b) La **reducción del nitrato** y la prueba del indol, pueden ser realizadas al final de las reacciones, ya que hay liberación de gas que puede interferir con la interpretación de las otras pruebas de la tira. No es necesario colocar la tapa plástica sobre la tira soporte después de la adición de reactivos.

c) Adicione los reactivos a los tubos de TDA y VP. En el primer caso, si la reacción es positiva, ésta es inmediata, mientras que en el tubo VP, la reacción puede demorarse hasta 10 minutos.

d) La prueba de reducción de nitratos, debe ser realizada para todos los organismos oxidasa positivos. Con la finalidad de evitar interferencias en la prueba, no se adicionarán reactivos al tubo de la GLUCOSA antes de la adición del reactivo de Kovac's a la prueba del indol.

Con la finalidad de hacer más objetiva la apreciación de las reacciones finales, tanto positivas como negativas, ver cuadro de reacciones N°1.

Todas las reacciones deben registrarse en la hoja de reporte. Las unidades empleadas en el análisis, deben ser esterilizadas, incineradas o inmersas en soluciones germicidas antes de desecharlas.

La identificación de los microorganismos se hace con el auxilio de cartas diferenciales, contenidas en el índice analítico.

CUADRO DE REACCIONES I

REACCION	REACCION POSITIVA	REACCION NEGATIVA
ONPG O-Nitrofenil-B-galactosidasa	Amarillo	Transparente
ADH Arginina dehidrolasa	Rojo o naranja	Amarillo
LDC Lisina descarboxilasa	Rojo o naranja	Amarillo
ODC Ornitina descarboxilasa	Rojo o naranja	Amarillo
CTT Citrato	Turquesa o azul oscuro	Ligeramente verde o amarillo
H2S Acido sulfhidrico	Formación de un depósito negro	No hay formación de dicho depósito
URE Urea	Rojo o naranja	Amarillo
TDA Triptófano deaminasa	ADICIONAR UNA GOTAS DE Café oro/ Café rojizo	CLORURO FERRICO 10 % Amarillo
IND Indol	ADICIONAR UNA GOTAS DE Rosa o rojo	REACTIVO DE KOVAC'S Transparente
VP Voges-Proskauer	ADICIONAR UNA GOTAS DE Rosa o rojo	KOH 40 % Y UNA GOTAS ALFA-NAFTOL. Transparente
GEL Hidrolisis de gelatina	Difusión del pigmento	No hay difusión de dicho pigmento
GLU Glucosa	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
MAN Manitol	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
INO Inositol	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
SOR Sorbitol	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
RHA Rafinosa	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
SAC Sacarosa	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
MEL Melobiosa	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
AMY Amilosa	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
ARA Arabinosa	Amarillo	Azul, azul-verde o verde
GLU Glucosa (Reacción neg.) Reducción de nitratos	ADICIONAR DOS GOTAS DE Y DOS GOTAS DE N.N. Rojo Finalmente adicionar	ACIDO SULFANILICO 0.8 % DIMETIL-ALFA-AMINA Amarillo conc. malla o granular

### **INOCULACION DEL SISTEMA API-20GP (UTIL EN LA IDENTIFICACION DE COCOS GRAMPOSITIVOS)**

Las tiras API-20GP, contienen 20 microtubos, cada uno de los cuales está constituido por un tubo y una pequeña cúpula.

Introducir la pipeta Pasteur en el tubo que contiene la suspensión. Inclinarse la tira soporte y llenar el tubo de los microtubos, colocando la punta de la pipeta a un lado de la cúpula, sin tocar el interior de esta.

Al depositar el volumen, se debe evitar la formación de burbujas de aire, que pueden causar interferencia con el reparto exacto del inóculo.

Colocar la tapa plástica sobre la tira soporte e incubar las unidades durante 18-24 horas a 35°-37°C.

### **LECTURA DE LAS TIRAS**

Después de 18-24 horas de incubación, registrar los resultados de todas las pruebas que requieren de la adición de reactivos. (Ver cuadro de reacciones N°2)

Todas las reacciones deben registrarse en la hoja de reporte.

La unidad debe ser esterilizada, incinerada o inmersa en germicida antes de desacharse.

### **IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

La identificación de los organismos puede ser hecha con la ayuda de cartas diferenciales, adjuntas en el empaque original, o bien con el sistema de reconocimiento del perfil 20GP.

**CUADRO DE REACCIONES Nº 2**

REACCION	REACCION POSITIVA	REACCION NEGATIVA
PHS Fosfatasa	Amarillo	Transparente o color paja muy tenue
URE Utilización de urea	Naranja, rojo-naranja o rojo	Amarillo, amarillo-naranja
GLS B-Glucosidasa	Amarillo	Transparente o color paja muy tenue
MNE Utilización de manosa	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
MAN Utilización de manitol	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
TRE Utilización de trehalosa	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
SAL Utilización de salicina	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
ARA Fermentación de arabinosa	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
SBS Fermentación de sorbosa	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
RAF Fermentación de rafinosa	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
SOR Fermentación de sorbitol	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
GLY Fermentación de glicerol	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
MNL Fermentación de manitol	Amarillo o amarillo-naranja	Naranja, rojo-naranja, rojo o púrpura
GLC B-Glucoronidasa	Amarillo	Transparente o color paja muy tenue
ARG Utilización de arginina	Naranja, rojo-naranja	Amarillo o amarillo-naranja
NGP B-Galactosidasa	ADICIONAR DOS GOTAS Púrpura o café	DE BB AZUL RAPIDO Amarillo
BEM Bilis esculina	Negro	Color bronce o ligeramente gris
ARN Hidrólisis de arginina	Rojo cereza	Amarillo a rojo naranja
NPG B-Galactosidasa	Color paja a amarillo	Transparente
PYR Acido pirroglutámico arilamidasa	ADICIONAR DOS GOTAS Rosa o púrpura	DE CINAMALDEHIDO Amarillo o naranja

## **INOCULACION DEL SISTEMA API-20C**

### **(UTIL EN LA IDENTIFICACION DE HONGOS Y LEVADURAS)**

El sistema API-20C, es un micrométodo que permite la interpretación de 19 pruebas de asimilación para la identificación de hongos y levaduras, clínicamente significativos. Las reacciones bioquímicas se completan después de 72 horas de incubación a 30°C.

Las ampollitas deben colocarse en un contenedor metálico con suficiente agua para que éstas floten, y deberán permanecer durante 5 minutos en el agua en ebullición, después, el medio se funde hasta asegurar licuefacción completa. No dejar que ebullición por más de 5 minutos. No dejar que el agua se evapore.

Si el agua se evapora, pueden explotar las ampollitas y destruirse.

Se requiere de guantes y vidrio de seguridad mientras se manipulan las ampollitas.

Distribuir aproximadamente, 10.0 ml de agua dentro del soporte de incubación para proveer una atmósfera húmeda durante la incubación.

Retirar la tira API del sobresello y colocarla en el soporte.

### **PREPARACION DE LA SUSPENSION DE LEVADURAS**

La temperatura de las ampollitas con el medio basal, deberá equilibrarse con la temperatura del cuarto antes de usarse. *No calentar las ampollitas frías.*

Colocar las ampollitas en un contenedor con agua en ebullición, deberá haber suficiente agua para que las ampollitas floten. Cubrir el contenedor.

Las ampollitas deberán permanecer en el agua en ebullición durante 5 minutos, después, el medio se debe observar totalmente licuado.

Colocar el contenedor con las ampollitas hervidas directamente en un baño de agua a 50°C +/- 2°C, permitiendo de esta manera, que las ampollitas se enfrien por 10-20 minutos. *No colocar las ampollitas en agua fría.*

Para abrir, sujetar la base de la ampollita con una mano en ángulo, lo cual prevendrá que se derrame, y romper el capuchón por la línea marcada en el cuello o ligeramente abajo.

A partir de un cultivo fresco de 48-72 horas de desarrollo en agar papa glucosa (PDA), preparar una suspensión de levaduras en el medio basal.

**API-20C.**

Tocar una colonia con buen aislamiento en PDA con aplicador estéril e inocular el medio basal presionando el aplicador contra un botón marcado en la ampollita. La turbidez del medio basal inoculado, debe ser perfectamente visible a la del medio basal licuado no inoculado.

*Nunca se debe preparar la suspensión con colonias que provengan de un medio de aislamiento que contenga agentes antimicrobianos.*

#### **INOCULACION DE LAS TIRAS**

Las tiras API-20C, contienen 20 cúpulas; con una pipeta Pasteur, inocular cada cúpula, evitando tocar el interior de esta, así como la formación de burbujas.

Llenar completamente la cúpula con la suspensión, hasta observarse ligeramente convexa, (una gota arriba del nivel).

Después de la inoculación, colocar la tapa sobre la tira soporte, e incubar 72 horas a 35°-37°C.

Se recomienda colocar, dentro de la incubadora, un vaso con agua, con la finalidad de incrementar la humedad.

Las reacciones deben leerse después de 24, 48 y 72 horas, y registrar los resultados en el cuaderno de trabajo.

La cúpula cero, sirve como un control negativo para reacciones de asimilación. Las cúpulas que muestren turbidez significativamente visible, en comparación a la de la cúpula cero, se considerará positiva.

Todas las reacciones deberán registrarse en la hoja de reporte.

#### **IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS**

La identificación de los microorganismos puede ser hecha con la ayuda de cartas diferenciales, incluidas en el empaque original API-20C.

Todas las unidades empleadas en el análisis, deben ser esterilizadas, incineradas o inmersas en germicidas y desecharse.

#### **MATERIALES**

Las identificaciones bioquímicas de los microorganismos se harán con la ayuda del sistema API (Analytical Profile Index).

Los siguientes materiales son proporcionados por el proveedor, e incluyen:

##### **API- 20E**

- 25 tiras API-20E
- 25 tiras soporte

- 25 tapas plásticas
- 25 formatos para reporte
- Manual de instrucciones de uso
- Índice de perfiles analíticos

**API- 20GP**

- 25 tiras API-20GP
- 25 tiras soporte
- Manual de instrucciones de uso
- Índice de perfiles analíticos

**API- 20C**

- 25 tiras API-20C
- 26 ampolletas con medio basal
- 25 tiras soporte
- 25 tapas plásticas
- 25 formatos para reporte
- Manual de uso
- Índice de perfiles analíticos

Adicionalmente debe prepararse:

- Tubos de ensayo con 5.0 mL de S.S.I. al 0.85 % y esterilizarlos.
- Aplicadores de madera estériles.
- Pipetas Pasteur.
- Incubadora 35°-37°C.
- Mechero.
- Pizeta.
- Aceite mineral.
- Cinc ( malla o granular).
- Asa microbiológica.
- Agar MacConkey.
- Bactident oxidasa.

Para las pruebas suplementarias se requiere:

- Medio glucosa (OF).
- Medio (GI), observación de movilidad.

Ambos medios son proporcionados por el mismo proveedor. Todos los reactivos deben conservarse en refrigeración.

### ANEXO N° 3 PROMOCION DE CRECIMIENTO

La promoción de crecimiento es una técnica que nos permite evaluar la eficacia de los medios de cultivo empleados en el laboratorio, retando una concentración conocida de microorganismos contra el medio de cultivo. Su efectividad estará en función del número de microorganismos recobrados, aun y cuando el inóculo de éstos sea muy bajo.

Inicialmente se utilizan microorganismos de prueba, en este caso, se trabajó con suspensiones bacterianas de:

<i>S. aureus</i>	ATCC- 6538P
<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC- 9027
<i>A. niger</i>	ATCC-10404

Las suspensiones bacterianas se preparan transfiriendo el desarrollo microbiano de un tubo que contiene agar inclinado a otro tubo con 10.0 mL de solución salina 0.9 % estéril.

Partiendo de la suspensión original, se preparan diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ . Esto se hace con la finalidad de cuantificar la población bacteriana de dicha suspensión.

De las diluciones anteriores, se seleccionan los tubos de  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  y se adiciona 1.0 mL de la suspensión de microorganismos de cada dilución en cajas Petri, seguido de 15.0 mL de agar casoy a una temperatura de 45°C, aproximadamente.

La prueba se instala por duplicado para cada dilución.

Las placas se incuban de 18 - 24 horas a 30 - 35°C en el caso de las bacterias, y para el hongo, de 24 -48 horas a 20 - 25°C.

Una vez concluido el periodo de incubación, se cuantifica el número de UFC/mL para cada una de las diluciones; los valores obtenidos se promedian y se considerarán aquellos que contengan entre 30 y 300 UFC/mL/placa.

Finalmente, ya con valores conocidos, se realizan diluciones nuevamente, hasta obtener de 10 - 100 microorganismos viables/mL, y se inoculan directamente a una caja Petri seguido de 15.0 mL de agar casoy a una temperatura de 45°C, aproximadamente

Si el medio de cultivo ha sido adicionado a las cajas Petri sin la suspensión bacteriana, se prepara un sistema de filtración estéril, y con pinzas estériles, se introduce una membrana de 0.45 micras en el sistema; se filtra 1.0 mL de la suspensión con 10 - 100 UFC/mL, en seguida se adicionan 300 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.2 estéril, para lavar la membrana y favorecer la distribución homogénea de los microorganismos.

Una vez que se ha filtrado la solución de lavado, se retira la membrana con las pinzas y se coloca sobre el medio de cultivo. Todas las actividades anteriores, se realizan bajo condiciones asépticas.

Las placas se incuban de 18 - 24 horas a 30 - 35°C para bacterias y de 24 - 48 horas a una temperatura de 20 - 25°C para hongos y levaduras.

**ANEXO N° 4  
CALCULOS**

Se obtuvo la  $\bar{X}$  aritmética para todas las áreas, considerando cada uno de los muestreos realizados.

Ejemplo: Area de sólidos  
- Tabletas I

N° DE MUESTREO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
N° UFC/m <sup>3</sup>	8	8	12	19	8	0	12	26	8	0	4	0	12	4	12
mR	-	0	4	7	11	8	12	14	18	8	4	4	12	8	8

E X	133
$\bar{X}$	8.87
mR	8.43
n	15

Los datos fueron evaluados utilizando las fórmulas siguientes:

$$-UCL = \bar{X} + A_2R$$

$$-LCL = \bar{X} - A_2R$$

$$-STD = R/d_2$$

Aplicando las fórmulas a los datos obtenidos:

$$UCL = 8.87 + 2.66 (8.43) = 31.29$$

$$LCL = 8.87 - 2.66 (8.43) = 13.55$$

$$STD = 8.43/3.267 = 27.54$$

• **NOTA:** Los datos numéricos de  $A_2$  y  $d_2$  son valores constantes, y se obtuvieron de tablas.

De esta manera se procesaron todos los datos obtenidos y, finalmente, se establecieron los parámetros para las especificaciones microbiológicas por área de muestreo; expuestas en la tabla 3.16.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- 1) **Acheson, J. D.** QUALITY CONTROL AND INDUSTRIAL STATISTICS., 5th, (1986).
- 2) **Analytical Profile Index.** CLINICAL YEAST SYSTEM., Division of Sherwood Medical. Analytab Products, (1985).
- 3) **Analytical Profile Index.** Enterobacteriaceae AND OTHER NEGATIVE GRAM BACTERIA., Division of Sherwood Medical. Analytab Products, 9th ed., (1989).
- 4) **Aspinall, L. J. and Kilsby, D.C.** A MICROBIOLOGICAL QUALITY CONTROL PROCEDURE BASED ON TUBE COUNTS., Journal of Applied Bacteriology, (1979), 46, pp 325 - 329.
- 5) **Avallone, H.** MICROBIAL CONTROL OF TOPICALS., (FDA) Pharmaceutical Technology, Apr. (1988), pp 55 - 62.
- 6) **Bartlett, R. C., Kohan, T. S. and Rutz, Ch.** COMPARATIVE COSTS OF MICROBIAL IDENTIFICATION EMPLOYING CONVENTIONAL AND PREPACKAGED COMMERCIAL SYSTEMS., American Journal of Clinical Pathology, vol. 71, N°2, Feb. (1979), pp 194 - 200.
- 7) **Biotest Diagnostics.,** BIOTEST RCS DETECTOR AMBIENTAL CENTRIFUGO., Laboratorio de productos biológicos HYLEA, S. A. de C. V.
- 8) **Blair, T. C.** FACTORS INFLUENCING THE SURVIVAL OF MICROBIAL CONTAMINATION OF SOLID ORAL DOSAGE FORMS., Ph. D. Tesis, (1989).
- 9) **Bloomfield, S. F., Baird, R., Leak, R. E. and Leech, R.** MICROBIAL QUALITY ASSURANCE IN PHARMACEUTICALS, COSMETICS AND TOILETRIES., Ellis Horwood Limited, (1988).
- 10) **Bochner, B.** IDENTIFICATION OF ENVIRONMENTAL BACTERIA , pp 223 - 225.

- 11) **Bredd, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R., BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY., The Williams and Wilkins Company.**
- 12) **British Farmacopoeae, (1993), vol. II**
- 13) **Butler, A. D., Lobregat, C. M. and Gavan, T. L. REPRODUCIBILITY OF THE ANALYTAB (API 20E) SYSTEM., Journal of Clinical Microbiology, Oct, (1975), vol. 2, N°4, pp 322 -326.**
- 14) **Buttner, M. P. and Stetzenbach, L. D. EVALUATION OF FOUR AEROBIOLOGICAL SAMPLING METHODS FOR THE RETRIEVAL OF AEROSOLIZED Pseudomonas syringae., Applied and Environmental Microbiology, Apr. (1991), vol. 57, N°4, pp 1991 - 1268.**
- 15) **Buttner, M. P. and Stetzenbach, L. D. MONITORING AIRBORNE FUNGAL SPORES IN AN EXPERIMENTAL INDOOR ENVIRONMENT TO EVALUATE AIR SAMPLING., Applied and Environmental Microbiology, Jan. (1993), vol 59, N°1, pp 219 - 226.**
- 16) **Campos, P. C. NUEVO METODO RAPIDO Y SENSIBLE PARA LA DETECCION ESPECIFICA DE HONGOS Y LEVADURAS: MALTHUS 2000., Pharma News, (1993), pp 31 - 32.**
- 17) **Carpenter, L. P. MICROBIOLOGY., 4th ed., (1989)**
- 18) **Code of Federal Regulations. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. 21 CFR Part 211, (1992).**
- 19) **CIPAM, GUIA DE PRACTICAS ADECUADAS DE MANUFACTURA FARMACEUTICA., Edición N°3, (1989).**
- 20) **Comité de elaboración de Guías oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. VALIDACION DE MEDIOS DE CULTIVO . Agosto, (1990).**

- 21) **Cox, N. A., Bailey, J. S. and Thomson, J. E.** EVALUATION OF FIVE MINITURIZED SYSTEMS FOR IDENTIFYING Enterobacteriaceae FROM STOCK CULTURES AND RAW FOODS., *Journal of Food Protection*, Oct. (1983), vol. 46, N°10, pp 914 - 916.
- 22) **Denyer, S. P. and Baird, R. M.** GUIDE TO MICROBIOLOGICAL CONTROL IN PHARMACEUTICALS., Ellis Horwood Limited, Series in Pharmaceutical Technology, (1990).
- 23) **DeVecchi.** VALIDATION OF AIR SYSTEMS., pp 156 - 158.
- 24) **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.** TEMAS SELECTOS DE MICROBIOLOGIA FARMACEUTICA., Asociación Farmacéutica Politécnica. I.P.N., Julio, (1987), México, D.F:
- 25) **Fimlt, G. W. and Fimlt, C.** Enterobacteriaceae IDENTIFICATION A COMPARATIVE STUDY OF API, ENCISE AND CONVENTIONAL METHODS., *The medical technologist*, Jan. (1975), vol. 5, N°1, pp 1 - 3.
- 26) **Finch, J. E., Prince, J. and Hawksworth, M.** A BACTERIOLOGICAL SURVEY OF THE DOMESTIC ENVIRONMENT., *Journal of Applied Bacteriology*, (1978), 45, pp 357 - 364.
- 27) **Flaum, I.** CONTAMINATION OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS., Review article. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Jan. (1978), vol. 67, N°1, pp 1 - 11.
- 28) **García, A. L., Plaza, C. J., De la Rosa, M. C. and Mosso, M. A.** CHARACTERIZATION OF *Bacillus cereus* STRAINS ISOLATED FROM DRUGS AND EVALUATION OF THEIR TOXINS., *Journal Applied Bacteriology*, (1988), 64, pp 257 - 264.
- 29) **Goshko, M. A., Pipes, W. O. and Christian, R. R.** POSSIBLE CONFUSION BETWEEN *Enterobacter agglomerans* AND *Escherichia coli*., *Pharmaceutical Technology*, Feb. 1984, pp 32 - 39.
- 30) **Graham, B. M.** CHOOSING MEDIUM AND TEMPERATURE FOR RECOVERY OF "TOTAL COUNT" IN PROCESS WATER. *GMP Newsletter*, March, (1992), pp 4 - 6.

- 31) **Harder, S. W.** THE VALIDATION OF CLEANING PROCEDURES.,  
Pharmaceutical Technology, May, (1984), pp 1 - 34 \*.
- 32) **Holmes, B., Humphry, P. S.** IDENTIFICATION OF Enterobacteriaceae WITH  
THE MINITEK., Journal of Applied Bacteriology, ( 1988), 64, pp 151 - 161.
- 33) **Hugo, W. B. and Russell, A. D.** PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY.,  
Blackwell Scientific Publications, (1977).
- 34) **Jarvis, B. and Easter, R.** RAPID METHODS IN THE ASSESSMENT OF  
MICROBIOLOGICAL QUALITY: EXPERIENCES AND NEEDS., Journal of  
Applied Bacteriology. Symposium supplement, (1987), pp 115S - 126 S.
- 35) **Keith, L. H.** ENVIRONMENTAL SAMPLING AND ANALYSIS. A PRACTICAL  
GUIDE., Lewis Publishers, (1991).
- 36) **Kelley, J. and Allsopp, D.** MOULD GROWTH TESTING OF MATERIALS,  
COMPONENTS AND EQUIPMENT TO NATIONAL AND INTERNATIONAL  
STANDARDS., Industrial Microbiological Testing, (1987), pp 23 - 37.
- 37) **Kremers, W.** MAXIMUM LIKELIHOOD ESTIMATION FOR THE ANDERSEN  
SAMPLER FOR LOG NORMALLY DISTRIBUTED PARTICLES., Drug  
Development and Industrial Pharmacy, (1993), 19 (14), pp 1747 - 1753.
- 38) **Levchuk, J. W. and Lord, A. G.** PERSONNEL ISSUES IN ASEPTIC  
PROCESSING., Pharmaceutical Technology International, Jan. (1990), pp 51 - 55.
- 39) **Levin, M. A., Seidler, R. J. and Rogul, M.** FIELD SAMPLING DESIGN AND  
EXPERIMENTAL METHODS FOR THE DETECTION OF AIRBORNE  
MICROORGANISMS. Chapter 27, Series Environmental Biotechnology Microbial  
Ecology. MacGraw-Hill, Inc. (1992), pp 543 - 555.
- 40) **Mac Faddin, J. F.** BIOCHEMICAL TEST FOR IDENTIFICATION OF MEDICAL  
BACTERIA., The Williams and Wilkins Company, Libermid Verlag, S. A., (1990).
- 41) **Manford, G III. and Hill, G. A.** COMPARISON OF MICRO-ID AND API 20E IN  
RAPID IDENTIFICATION OF Enterobacteriaceae., Journal of Clinical  
Microbiology, May, (1982), vol. 15, N°5, pp 885 - 890.

- 42) **Niskanen, A. and Pohja, M. S.** COMPARATIVE STUDIES ON THE SAMPLING AND INVESTIGATION OF MICROBIAL CONTAMINATION OF SURFACES BY THE CONTACT PLATE AND SWAB METHODS., *Journal of Applied Bacteriology*, (1977), 42, pp 53 - 63.
- 43) **Noble, W. C. and Savin, J. A.** STEROID CREAM CONTAMINATED WITH *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*, Feb. 12 (1966), pp 347 - 349.
- 44) **O'Hara, D. L. and Miller, J. M.** REEVALUATION OF THE API 20E IDENTIFICATION SYSTEM VERSUS CONVENTIONAL BIOCHEMICALS FOR THE IDENTIFICATION OF MEMBERS OF THE FAMILY *Enterobacteriaceae*: A NEW LOOK AT AN OLD PRODUCT., *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. (1992), vol. 30 N°1, pp 123 - 125.
- 45) **Overman, T. L., Kessler, J. F. and Seabolt, J. P.** COMPARISON OF API 20E, API RAPID E AND API RAPID NPT FOR IDENTIFICATION OF MEMBERS OF THE FAMILY *Vibrionaceae*., *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. (1985), vol. 22, N°5, pp 778 - 781.
- 46) **Parenteral Drug Association, Inc.**, VALIDATION OF ASEPTIC FILLING FOR SOLUTION DRUG PRODUCTS., Technical Monograph N°2, August, (1987), pp 9 - 14.
- 47) **Parenteral Drug Association, Inc.**, FUNDAMENTALS OF A MICROBIOLOGICAL ENVIRONMENTAL MONITORING PROGRAM., Technical Report N°13, *Journal of Parenteral Science and Technology*, March 23, (1993), vol. 44, Supplement (1990), pp S1 - S16.
- 48) **Pelczar, M. J. Jr., Reid, R. D. and Chan, E. C. S.** MICROBIOLOGY., MacGraw-Hill, 4th. ed., Feb. (1988).
- 49) **Ringertz, O. and Ringertz, S. H.** THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF MICROBIAL CONTAMINATION IN PHARMACEUTICAL AND ALLIED PRODUCTS., pp 201 - 226.

50) **Robertson, E. A., Macks, G. C. and MacLowry, J. D.** ANALYSIS OF COST AND ACCURACY OF ALTERNATIVE STRATEGIES FOR Enterobacteriaceae IDENTIFICATION., *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. (1976), vol. 3, N°4, pp 421 - 424.

51) **Scott, E., Bloomfield, S. F. and Barlow, C. G.** A COMPARISON OF CONTACT PLATE AND CALCIUM ALGinate SWAB TECHNIQUES FOR QUANTITATIVE ASSESSMENT OF BACTERIOLOGICAL CONTAMINATION OF ENVIRONMENTAL SURFACES., *Journal Applied Bacteriology*, (1984), 56, pp 317 - 320.

52) **Stoakes, L., Schieven, B. C., et. al.** EVALUATION OF MICROSCAN RAPID POS COMBO PANELS FOR IDENTIFICATION OF Staphylococci., *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. (1992), vol. 30, N°1, pp 93 -95.

53) **Sveshtarova, P. B.** CURSO DE MICROBIOLOGIA GENERAL., Facultad de Química, U. N.A.M., (1991).

54) **Syntex Manufacturing Standars.** MICROBIOLOGICAL CONTROL NON STERILE AREAS., Chapter VIII, Jun. 7, (1993), pp 1 - 9.

55) **UNISCEPT 20E SYSTEM.** Analytab Products. Division of Sherwood Medical, (1986).

56) **UNISCEPT 20GP SYSTEM.** Analytab Products. Division of Sherwood Medical, (1990).

57) **Van Vuuren, H. J.J., Kersters, K., De Ley, J. and Toerien, D. F.** THE IDENTIFICATION OF Enterobacteriaceae FROM BREWERIES COMBINED USE AND COMPARISON OF API 20E SYSTEM, GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS AND GAS CHROMATOGRAPHY OF VOLATILE METABOLITES., *Journal of Applied Bacteriology*, (1981), 51, pp 51 - 65.

58) **Vélez, P. G.** MANUAL DE VIAS METABOLICAS., Facultad de Química, U.N.A.M., (1987).

59) **Wasynczuk, J.** VALIDATION OF ASEPTIC FILLING PROCESSES.,  
**Pharmaceutical Technology**, May (1986), pp 36 - 43.

60) **Whyte, W.** and **Niven, L.** AIRBORNE BACTERIA SAMPLING: THE EFFECT OF  
DEHYDRATION AND SAMPLING TIME., **Journal of Parenteral Science and  
Technology**, August 20, (1986), pp 182.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA