



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

VALIDACION DEL METODO DE LIMITES MICROBIANOS PARA LA CUANTIFICACION DE MICROORGANISMOS MESOFILICOS AEROBIOS EN UNA SUSPENSION ANTIACIDA

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
SILVIA MACEDO ALVAREZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LA UNAM Y LAS FACULTADES DE ESTUDIOS SUPERIORES

MEXICO, D. F.

ABRIL DE 1997

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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Q.F.B MAURO ARRIETA SÁNCHEZ.

VOCAL: Q.F.B RAMÓN SOTO VÁZQUEZ.

SECRETARIO: Q.F.B CESAR ESCAMILLA FLORES.

SUPLENTE: Q.F.B ANGEL BARAJAS CHAVARRIA.

SUPLENTE: Q.F.B ROSA MARÍA CRUZ HERNANDEZ.

ASESOR DEL TEMA: RAMÓN SOTO VÁZQUEZ

AGRADECIMIENTOS

**A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

Gracias por la formación profesional recibida.

**Gracias Por el apoyo brindado, para que se llevará
a cabo la realización del presente trabajo:**

LABORATORIO RHONE- POULENC RORER

Q.F.B: GERARDO PÉREZ

Q.F.B: GINA ZARAGOZA

LABORATORIO TERAPIA INFANTIL

I.Q: LORENA AGUILAR

LIC: RIGOBERTO AGUILAR

y en especial a los Profesores:

Rosa María Cruz Hernández, Cesar Escamilla

Flores, Ramón Soto Vázquez.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Socorro y Leoncio, por darme esta maravillosa vida.

Por darme raíces tan fuertes y alas tan ligeras para realizar la misión que me ha tocado vivir.

Por enseñarme con su ejemplo a ser fuerte cuando el viento me esta siendo contrario y saber elevar al cielo los ojos con humildad para pedir ayuda.

Por enseñarme a amar a Dios sobre todas las cosas y con ello me han dado el mejor regalo.

Por esto y por mucho más Gracias Papás.

A MIS HERMANOS

Gracias por su amistad, apoyo, comprensión, dedicación y cariño incondicional brindado.

DEDICATORIAS

A MIS AMIGOS

**Rosa María, María Elena, Hilda, Lalo,
Porque gracias a ellos y a sus críticas, pude
lograr uno de mis sueños más grandes de mi
vida.**

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO

**Por su amistad y apoyo en mi desarrollo
profesional.**

**Les agradezco de antemano a todas aquellas
personas que intervinieron en la realización
de este trabajo.**

I N D I C E

INTRODUCCIÓN

CAPITULOS

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	1
1.0 Validación	1
1.1 Conceptos generales de validación y su determinación	3
2.0 Límites microbianos	10
3.0 Contaminación microbiológica de productos farmacéuticos	13
3.1 Principales causas de contaminación de productos farmacéuticos	14
4.0 Factores físicos que influyen en el desarrollo microbiano	16
5.0 Características de los microorganismos en estudio	18
6.0 Antiácidos gástricos	30

7.0 Material y método	35
7.1 Material	35
7.2 Reactivos	35
7.3 Material biológico	36
7.4 Equipo	37
7.5 Instrumentos	37
7.6 Medios de cultivo	38
7.7 Método	39
8.0 Resultados y Discusión de Resultados	47
8.1 Linearidad del Método	47
8.2 Exactitud y Repetibilidad	54
8.3 Reproducibilidad del Método	57
8.4 Resultados experimentales de las características macroscópicas y bioquímicas de los microorganismos en estudio	60
9.0 Conclusiones	66
10.0 Propuestas y/o recomendaciones	67
11.0 Bibliografía	68
APENDICE A (MEDIOS DE CULTIVO)	72
APENDICE B (FORMULAS)	95

INDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Parámetros a evaluar en la validación del método.	2
2. Criterios de aceptación en la linealidad del sistema.	3
3. Criterios de aceptación en la linealidad del método.	4
4. Criterios de aceptación en pruebas de estabilidad.	9
5. Características para <u>Escherichia coli</u> .	18
6. Pruebas bioquímicas para <u>Escherichia coli</u> .	19
7. Características para <u>Pseudomonas aeruginosa</u> .	22

TABLA	PÁGINA
8. Pruebas bioquímicas para <u>Pseudomona aeruginosa.</u>	23
9. Características de <u>Salmonella s.p.</u>	26
10. Pruebas bioquímicas para <u>Salmonella s.p.</u>	27
11. Resultados obtenidos en la linealidad del método.	47
12. Parámetros estadísticos en la linealidad del método.	51
13. Intervalo de confianza para la linealidad del método.	52
14. Resultados obtenidos en la exactitud y repetibilidad del método.	54

TABLA	PÁGINA
15. Parámetros estadísticos para la exactitud y repetibilidad del método.	55
16. Criterios de aceptación para la exactitud.	55
17. Criterios de aceptación para la repetibilidad.	56
18. Resultados obtenidos en la reproducibilidad del método.	57
19. Parámetros estadísticos en la reproducibilidad del método.	57

TABLA	PÁGINA
20. Tabla de análisis de varianza para la reproducibilidad del método.	58
21. Resultados obtenidos en las características macroscópicas de <u>Escherichia coli</u> .	60
22. Resultados obtenidos en las características macroscópicas de <u>Pseudomona aeruginosa</u> .	61
23. Resultados obtenidos en las características macroscópicas de <u>Salmonella typhimurium</u> .	62
24. Resultados experimentales de pruebas bioquímicas de los microorganismos en estudio.	64

INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PÁGINA
1. Resultados obtenidos en la linealidad del método para <u>Escherichia coli</u> .	48
2. Resultados obtenidos en la linealidad del método para <u>Pseudomona aeruginosa</u> .	49
3. Resultados obtenidos en la linealidad del método para <u>Salmonella typhimurium</u> .	50

INDICE DE TABLAS DEL APÉNDICE

TABLA	PÁGINA
A-1. Composición del Agar Nutritivo.	76
A-2. Composición del Agar Soya Trypticaseína.	77
A-3. Composición del agar Sal Manitol.	78
A-4. Composición del agar Verde Brillante.	79
A-5. Composición del agar Eosina Azul de Metileno.	80
A-6. Composición del agar FLO.	81
A-7. Composición del agar Hierro Triple Azucar.	82
A-8. Características de algunos microorganismos en el medio TSI.	83

TABLA	PÁGINA
A-9. Composición del agar Cittrato de Simmons.	84
A-10. Composición del medio MIO.	85
A-11. Composición del medio SIM.	86
A-12. Características de algunos microorganismos en el medio SIM.	86
A-13. Composición del Caldo Peptona de Caseína lecitina Tween.	87
A-14. Composición del Caldo Tergitol 7.	88
A-15. Composición del Caldo Soya Tipticaseína.	89
A-16. Composición del Caldo Celenito Cistina.	90

TABLA**PÁGINA**

A-17. Composición del Caldo Citrato de Koser.	91
A-18. Composición del Caldo Rojo de Metilo Vogues Proskauer.	92
A-19. Composición del Caldo Rojo de Fenol y Manitol.	93
A-20. Composición del Caldo Base de Rojo Fenol.	93
A-21. Composición del Caldo Rojo Fenol y Lactosa.	94
A-22. Composición del Caldo Rojo Fenol y Dextrosa.	94
A-23. Composición del Caldo Rojo Fenol y Sacarosa.	94

INTRODUCCIÓN

La importancia de realizar la prueba de límites microbianos, se estableció a raíz de problemas que existieron sobre contaminación microbiana de productos farmacéuticos no estériles en Suiza, por lo que en 1966-1972, se originaron regulaciones en diferentes farmacopeas y en relación a las buenas prácticas de manufactura, pero cabe mencionar que fue hasta la FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 4a. edición (1974), donde se implementa esta técnica de análisis, pero esta es válida siempre y cuando se realicen pruebas preliminares que demuestren que bajo estas condiciones es posible recuperar a los microorganismos inoculados previamente en una muestra, o sea que el método microbiológico sea VALIDADO, entendiéndose por validación como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas; generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, pero sin embargo cabe mencionar que estos parámetros a evaluar depende de las características del método, así como del criterio del analista.

El objetivo del presente trabajo es: comprobar que el método de límites microbianos es lineal, exacto, y preciso, mediante la cuantificación y detección de microorganismos mesofílicos aerobios en una suspensión antiácida. Confirmándose los resultados con la determinación de las características macroscópicas, microscópicas, pruebas bioquímicas y tratamiento estadístico a evaluar.

Por lo mencionado anteriormente en el capítulo 1, se mencionan los conceptos generales sobre validación, su importancia, así como la determinación de estos.

En el campo farmacéutico se ha establecido la necesidad de incluir en los ensayos de control de rutina la determinación del número y tipo de gérmenes, para evitar variaciones de un medicamento en cuanto a su aspecto, olor, sabor, consistencia, disminución de su actividad y otros, los tipo de microorganismos aislados de esta manera deberán investigarse en relación a su posible importancia como agentes de enfermedades. El método de límites microbianos, evalúa la calidad sanitaria de productos farmacéuticos (materias primas, productos intermedios y terminados) mediante el recuento de organismos mesofílicos aerobios, hongos filamentosos y levaduras, así como la investigación de microorganismos objetables en dichos productos. En el capítulo 2 se encuentra información más general sobre el método de límites microbianos.

Aunque la Industria Farmacéutica reconoce la necesidad de efectuar un control microbiológico a las formas farmacéuticas no estériles que son susceptibles a la contaminación microbiana, es imposible que algunos productos estén libres de microorganismos, sin embargo para la protección del consumidor y del fabricante es necesario tomar medidas apropiadas para asegurar la calidad microbiológica del producto, en el cual las principales fuentes de contaminación son: el medio ambiente, personal, materias primas, material y equipo. El capítulo 3, menciona en una forma más general las principales causas de contaminación de productos farmacéuticos.

Los microorganismos patógenos considerados en el método de límites microbianos son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*.

El estudio de estos depende de la vía de administración del producto. Como en el presente trabajo se llevó a cabo la validación de una suspensión antiácida conteniendo hidróxido de aluminio y magnesio. La FEUM 6a. edición recomienda investigar a *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* En el capítulo 4, se encuentra información sobre los factores físicos que influyen en el desarrollo microbiano. Mientras que el capítulo 5, menciona las características macroscópicas, microscópicas, y principales bioquímicas de los microorganismos en estudio. Así mismo en el capítulo 6, se mencionan las características de los antiácidos gástricos.

En el capítulo 7, contiene información sobre el material, equipo y método. En el capítulo 8, incluye resultados y discusión de resultados. Así mismo el capítulo 9, da a conocer las conclusiones, y en el capítulo 10, se hace mención de las propuestas y/o recomendaciones. En el apéndice A, contiene información sobre medios de cultivos y el apéndice B, incluye fórmulas empleadas.

Con base a los resultados obtenidos experimentalmente y sometidos al tratamiento estadístico necesario se puede concluir que el método resultó ser lineal, exacto, y preciso, reafirmando que realmente se recuperó a los microorganismos inoculados, con las características microscópicas, macroscópicas y pruebas bioquímicas realizadas a cada microorganismo en estudio. Por lo tanto el método puede ser usado como método de rutina para determinar el control microbiológico en la suspensión antiácida.

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

1.0 - VALIDACIÓN

La Industria Farmacéutica tiene gran interés en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que están relacionados con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados. Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

No se puede pasar por alto el hecho de que, el factor más importante durante la validación de cualquier método analítico, es siempre el criterio del analista, el cual es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados con el, o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis propósito de la técnica analítica, instrumentación sustancias relacionadas, etc., por lo que los requisitos mencionados a continuación constituyen únicamente una guía apropiada, para dar al analista un soporte técnico adecuado para resolver el problema particular. (1)

PARÁMETRO	CONTROL DE CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD		BIODISPONIBILIDAD	REVALIDACION DEL METODO	
		Bajas concentraciones	Altas concentraciones		Sin cambio en las condiciones de operación	Con cambio en las condiciones de operación
Linealidad y precisión del sistema	X	X	X	X	X	X
Límite de detección		X		X		
Límite de cuantificación		X		X		
Exactitud y repetibilidad al 100 %	X	X	X	X	X	X
Linealidad del método	X	X	X	X	X	X
Precisión (Reproducibilidad)	X	X	X	X		X
Especificidad (Control de Calidad)	X	X	X	X	X	X
Especificidad (Estabilidad)		X	X			
Tolerancia del sistema		X	X	X		X
Estabilidad de la muestra	X	X	X	X		

TABLA 1. PARAMETROS A EVALUAR EN LA VALIDACION DEL METODO

1.1 CONCEPTOS GENERALES DE VALIDACIÓN Y SU DETERMINACIÓN

LINEARIDAD: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

DETERMINACIÓN DE LINEARIDAD DEL SISTEMA

Se realiza construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de los requerimientos de estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100%. (1)

$c.v \leq 1.5\%$
$r \geq 0.99$
$r^2 \geq 0.98$

TABLA 2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN EN LA LINEARIDAD DEL SISTEMA

NO TA. para métodos microbiológicos $r \geq 0.98$

DETERMINACIÓN DE LINEARIDAD DEL MÉTODO

Se realiza a partir de placebos adicionados de por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, realizando el análisis por triplicado. Se deberá llevar a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre a la correspondiente al 100%.

MÉTODO	PROMEDIO DE RECOBRO	CV	m	b	r^2
Cromatográficos	98-102%	$\leq 2\%$	≈ 1	≈ 0	≥ 0.98
Titrimétricos	98-102%	$\leq 2\%$			
Químicos y Espectrofométricos	97-103%	$\leq 3\%$			
Microbiológicos	95-105%	$\leq 5\%$			

TABLA 3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA LINEARIDAD DEL METODO

INTERVALO: El intervalo de un método analítico esta definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal. (1)

EXACTITUD: La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés.

DETERMINACIÓN

Se realiza partiendo como mínimo de 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración al 100%. Realizando el método bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Los criterios de aceptación para la Exactitud y Repetibilidad son los indicados en la tabla 3.

PRECISIÓN: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **REPETIBILIDAD:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc..).

DETERMINACIÓN

Se realiza partiendo como mínimo de 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración al 100%. Realizando el método bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. (1)

• **b) REPRODUCIBILIDAD:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc..)

DETERMINACIÓN

Se realiza utilizando una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

LIMITE DE DETECCIÓN: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

LIMITE DE CUANTIFICACIÓN: Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

ESPECIFICIDAD: Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD CON EL MÉTODO PROPUESTO.

- 1) Analizar placebos del producto.
- 2) Identificar la respuesta del activo, y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

CRITERIO: Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes. (1)

ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD

En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar las muestras con placebo "añadido" de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones. La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida por lo menos en un 25% con respecto a la original.

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia, la persona que realice el estudio deberá escoger aquel que, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado:

1. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70-120°C o 20°C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un número apropiado de días (2 a 4 semanas).

2. Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote a luz UV o a luz fluorescente y/o humedad.

3. Si es necesario, hacer diluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o 10-12 y colocarlas a 60°C-80°C durante 2-4 semanas.

4. Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrogeno) y permanecer 2-4 semanas a temperatura ambiente; y/o por hidrólisis (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60-80°C durante 2 - 4 semanas.

CRITERIO: Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado. Ajustar a las condiciones de operación para obtener la máxima resolución. (1)

TOLERANCIA: La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

DETERMINACIÓN

Se realiza por medio de la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidos de la luz, etc..) durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista. (1)

CRITERIO: La muestra es estable si el I.C para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda de los siguientes porcentajes:

MÉTODO	PORCENTAJE
Cromatográficos	$\pm 2\%$
Titrimétricos	$\pm 2\%$
Químicos y espectrofotométricos	$\pm 3\%$
Microbiológicos	$\pm 5\%$

TABLA 4. CRITERIO DE ACEPTACION EN LAS PRUEBAS DE ESTABILIDAD

2.0 LÍMITES MICROBIANOS

La variedad de contaminantes de orígenes diversos (animal, vegetal, humano, e incluso sintético) representa una de las causas más comunes de la contaminación que puede esperarse en un medicamento no estéril. Para verificar la calidad de los productos (materias primas y productos terminados) las instituciones oficiales y de la industria farmacéutica y farmoquímica, pueden utilizar diversos métodos de análisis, según sus necesidades.

LIMITES MICROBIANOS: *Es un conjunto de pruebas cuyo objetivo es evaluar la calidad sanitaria de productos farmacéuticos (materias primas, productos intermedios y terminados), mediante el recuento de organismos mesofílicos aerobios, hongos filamentosos y levaduras, así como, la investigación de microorganismos objetables en dichos productos. (2)*

En los métodos farmacopéicos se describe el método de "Límites microbianos", pero sin embargo, si no existen se deberán establecer internamente, tomándose en consideración el origen, uso, y antecedentes analíticos de la materia prima o del producto terminado. Los cuales comprenden:

A) Estimación del número de microorganismos mesofílicos aerobios viables, conocidos como unidades formadoras de colonias (UFC), que son la cantidad mínima de microorganismos objetables.

B) Aislamiento e identificación de microorganismos objetables. (23)

Los límites microbianos que menciona la FEUM 6a. edición para la forma farmacéutica utilizada en el presente estudio (una suspensión antiácida que contiene Hidróxido de aluminio y Magnesio) son los siguientes :

MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS: Máx. 100 UFC/ml

HONGOS Y LEVADURAS: Máx. 10 UFC/ml

MICROORGANISMOS PATÓGENOS: Ausencia

La validez de este conjunto de pruebas, se basa en su capacidad para poner en evidencia a todos los microorganismos presentes en un producto farmacéutico.

Por esta razón antes de establecer en forma rutinaria el análisis de un producto, es necesario establecer pruebas preliminares que demuestren que bajo las condiciones de prueba, es posible recuperar los microorganismos control previamente inoculados en la muestra.

MICROORGANISMOS CONTROL

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 25619
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6539
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536

En función de la vía de administración se procederá a investigar los microorganismos señalados a continuación:

PRODUCTOS DÉRMICOS, RECTALES Y VAGINALES:

Pseudomona aeruginosa y *Staphylococcus aureus*.

PRODUCTOS ORALES:

Escherichia coli y *Salmonella* sp.

MATERIAS PRIMAS:

Dependiendo de la vía de administración del producto. Investigar los microorganismos señalados además de *Pseudomona* sp.

Cabe mencionar que los microorganismos mencionados anteriormente son elegidos por previos estudios realizados a diferentes formas farmacéuticas en los cuales se demuestra que es posible su desarrollo. Sin embargo hay microorganismos que aunque no son considerados patógenos por sus características, número y además, por la composición del producto, pueden afectar la estabilidad de éste y/o indicar un manejo sanitario deficiente de materia prima o medicamento, causando un problema adicional al paciente. En consecuencia, es conveniente tratar de aislar, identificar y reportar estos microorganismos, lo que permitirá conocer mejor la calidad del proveedor, diseñar un seguimiento durante el proceso y ver si no se trata de una contaminación secundaria y así establecer las medidas que corrijan la falla. (2)

3.0 CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

En los últimos años se ha tenido problemas en fabricación de productos farmacéuticos líquidos como es el caso de lociones para bebés y leche de magnesia por contaminación microbiana. En una inspección de envases para preparados antiácidos líquidos que tenían hidróxido de magnesio, se comprobó que el 30.5% de los frascos analizados estaban contaminados con Pseudomona aeruginosa. En el recuento en placa de microorganismos mesofílicos aerobios se encontró desde la cantidad de 100- 9300, ufc/g. De igual manera diversos medicamentos han sido responsables de incidentes, como salmonelosis por polvos de tiroides, o úlceras oculares debida a las preparaciones oftálmicas contaminadas por Pseudomona aeruginosa.

La gama de microorganismos capaces de contaminar preparados líquidos comprende especies de Salmonella sp., E.coli, Pseudomona aeruginosa, y Staphylococcus aureus. (3)

3.1 PRINCIPALES CAUSAS DE CONTAMINACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

MATERIAS PRIMAS

Las materias primas son una de las mayores fuentes de contaminación microbiana en formas farmacéuticas no estériles.

Las materias primas pueden ser de origen vegetal, animal, o sintético, las cuales por su forma de obtención, presentan un problema de contaminación menor que el de sustancias de origen animal, como lo serán los extractos de ciertos tejidos animales los cuales son ricos en nutrientes. Estos tejidos que a menudo se reciben o provienen de rastros o matanzas debe suponerse que vienen contaminados por lo tanto la contaminación inicial debe ser eliminada y de este paso en adelante se deben tener controles estrictos para evitar una contaminación durante el resto del proceso de manufactura.

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AGUA

El agua es probablemente el material más importante usado en la manufactura de productos farmacéuticos no estériles así como en el lavado de material y equipo. Como resultado la calidad microbiológica del agua es extremadamente importante. El agua suministrada será sujeta a frecuentes análisis microbiológicos, sobre todo cuando el agua para beber no evita la presencia de microorganismos como: Pseudomona aeruginosa o Pseudomona cepacia.

Aún si el agua es satisfactoria, la contaminación puede ocurrir durante el almacenaje, por ejemplo, los sistemas de deionización del agua son bien conocidos como sitios de crecimiento para microorganismos, y el análisis microbiológico es necesario en varias etapas a lo largo del sistema de deionización (resinas catiónicas, aniónicas, etc...).

Los microorganismos pueden crecer prolíficamente cuando los tanques de almacenamiento no son rutinariamente sanitizados. Codos y curvas en la distribución del sistema también pueden llegar a ser fuentes mayores de crecimiento microbiano. (4)

MATERIAL DE EMPAQUE

También es importante considerar los materiales en que son envasadas las materias primas: Cartón, papel, recipientes metálicos, de plástico. 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.

EQUIPOS

Los equipos también pueden ser fuente de contaminación microbiana ya que las bacterias pueden desarrollarse en los resquicios y ranuras. Estos equipos deben limpiarse muy bien antes de usarse.

Una sanitización eficiente es esencial en una planta. El equipo debe estructurarse de tal forma que pueda ser desensamblado para lavarlo, sanitizarlo y secarlo. Cualquier equipo o maquinaria que entre en contacto con el producto y que no pueda ser revisada y drenada completamente constituyen un riesgo de contaminación microbiana.

Realizando un control microbiológico después de las operaciones de sanitización y a diferentes intervalos entre los procesos de sanitización, se obtendrán datos que probaran su efectividad, el control microbiológico no sólo debe enumerar los contaminantes, sino identificarlos para revelar la presencia de microorganismos resistentes al agente sanitizante.

MEDIO AMBIENTE Y PERSONAL

EL ambiente y personal pueden contribuir a la contaminación del producto. Los portadores principales de contaminación son las manos y el pelo. Por lo tanto, la limpieza general es primordial. Las personas que intervienen en el proceso de elaboración deben usar gorro y cubrebocas, y otro tipo de vestimenta dependiendo donde se requiera trabajar.

El número de microorganismos en el aire en una área determinada dependerá principalmente de 3 factores (6):

- a) Número de personas y tipo de actividad.
- b) Cantidad de partículas en el ambiente.
- c) Grado de humedad.

4.0 FACTORES FÍSICOS QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO MICROBIANO

HUMEDAD

Diversos factores físicos influyen en el desarrollo microbiano y esto debe tenerse en cuenta cuando se estudia la conservación de los preparados farmacéuticos. La humedad favorece este desarrollo y no hay duda que los preparados más expuestos son los que contienen agua como solvente o como integrante de una de las fases. Pero también las formas secas o sólidas se prestan para el desarrollo. Tal es el caso de la granulación húmeda en la elaboración de comprimidos, en que se dan precisamente las condiciones de humedad y temperatura que requiere el desarrollo microbiano. (8)

TEMPERATURA

La temperatura influye en el desarrollo de los microorganismos. Las bacterias que crecen entre los 20°C y 45°C, aunque la temperatura óptima suele ser de 35°C a 37°C, se designan como *mesófilos*. Estos tipos de microorganismos son los que se pueden desarrollar en el cuerpo humano ya que nuestra temperatura normal es a 37°C.

Algunos microorganismos, como por ejemplo los que viven en el fondo del mar se desarrollan mejor a temperaturas vecinas del punto de congelación (-4-10°C), y se les llaman *psicrófilos*.

Otras especies, solo se desarrollan a temperaturas altas, que fluctúan entre 45-75°C. Estos microorganismos, de los que existen numerosas especies bacterianas, se designan como *termófilos*. (20)

pH

Numerosos microorganismos, especialmente los que ocasionan enfermedad, son afectados diversamente por grados incluso moderados de acidez o alcalinidad. Tan sensibles son a ello, que se hace necesario ajustar el pH de los medios empleados para su cultivo, añadiéndoles ácido o álcali, según sea el caso, de modo que el medio resulte neutro o ligeramente alcalino.

En general las bacterias se desarrollan en una zona estrecha de pH, los hongos en una zona más amplia. El ajustar el pH hacia las zonas más ácidas o alcalinas constituye un recurso para aumentar la eficacia de los conservadores o disminuir la velocidad de desarrollo de los microorganismos o ambas cosas a la vez. Pero al mismo tiempo, este ajuste puede causar problemas en la estabilidad del producto. Por ello la elección del conservador debe ser la adecuada.

PRESIÓN OSMÓTICA

Se ha comprobado que muchos microorganismos son sensibles a líquidos conteniendo altas concentraciones (6 %-25%) de sal o de azúcar, en cuyo medio no pueden desarrollarse ni producir deterioro. Dichas soluciones poseen una propiedad física llamada *presión osmótica*, que tiende a extraer el agua de las células vivas, lo que provoca colapso, destruyéndolas o manteniéndolas en estado inerte. Una presión osmótica alta, se traduce en buena conservación. Pero no siempre se puede agregar a un preparado esta concentración. (8)

5.0 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

Escherichia coli

Es un microorganismo gram negativo, facultativo, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, predominante en el intestino grueso del hombre por ello se denomina también "colibacilo", su presencia en el agua indica generalmente la existencia de contaminación fecal.

Algunas cepas producen beta hemólisis en agar-sangre, son móviles, producen lisina descarboxilasa y utilizan acetato como única fuente de carbono

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Agar Mac Conkey	Colonias grandes rosas-rojas rodeadas de una zona de precipitación	Bacilos gram negativos
Agar Levine-azul de metileno	Colonias pequeñas de color azul negro con brillo metálico de color verde.	Bacilos gram negativos

TABLA 5. CARACTERÍSTICAS PARA *Escherichia coli*. (2)

	PRUEBAS BIOQUIMICAS	RESULTADOS
	CITRATO DE KOSER	-
	CITRATO DE SIMONS	-
TSI	GAS (H ₂)	+
	H ₂ S	-
	FONDO	ÁCIDO
	PICO	ÁCIDO
	CALDO ROJO FENOL Y	-
	MANITOL	-
	SACAROSA	+
	GLUCOSA	-
	LACTOSA	+
SIM	INDOL	+
	H ₂ S	-
	MOVILIDAD	+/-
RMVP	RM	+
	VP	-
	MIO	+ (tardía)
	UREASA	-
	FENIL	-
	ALANINA	-
	LISINA	*d

TABLA 6. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA *Escherichia coli* (9,17)

*d = positiva tardía (3-5 días)

MANIFESTACIONES CLÍNICAS: *E. coli* es la causa más común de infecciones de las vías urinarias en el hombre. Esta enfermedad puede variar de cistitis a pielonefritis. Es más probable que las mujeres presenten infecciones urinarias a una edad menor, siendo muy importantes factores como maduración sexual, partos y tumores.

E. coli es causante de meningitis neonatal, pero rara vez causa meningitis en poblaciones de edad mayor.

Puede aislarse *E. coli* de heridas infectadas, particularmente en el abdomen, la peritonitis causada por *E. coli* y otros microorganismos intestinales da como resultado una complicación frecuente de un apéndice roto. También puede invadir el torrente circulatorio durante cualquiera de las infecciones ya mencionadas.

No se comprende totalmente el papel de *E. coli* en la enfermedad diarreica. Una estimación habla de una incidencia del 4% de diarrea en niños de países no desarrollados, donde la higiene y salud pública son deficientes. Además, la *E. coli* enterotoxigénica son una causa principal de la diarrea del viajero que ocurre cuando personas de países desarrollados viajan a una región endémica.

SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS: Excepto la benzilpenicilina, las enterobacterias son intrínsecamente sensibles a concentraciones factibles séricas y tisulares de casi todos los antimicrobianos, cuando se introducen por primera vez. Sin embargo, las cepas resistentes se seleccionan rápidamente porque las enterobacteriaceas del tracto intestinal normal se exponen frecuentemente a antibióticos dirigidos a otras bacterias más invasivas. (9,10,11).

Pseudomana aeruginosa

MORFOLOGÍA: La *P. aeruginosa* es un bacilo gram negativo de 0.5 a 1 por 3 a 4 micras. Habitualmente posee un único flagelo polar, pero ocasionalmente pueden constatarse dos o tres flagelos. Produce una capa de polisacárido extracelular, similar a una cápsula.

La *P. aeruginosa* es un microorganismo extremadamente adaptable que puede utilizar más de 80 compuestos orgánicos diferentes para su crecimiento. Puede crecer en los medios utilizados para el aislamiento de enterobacterias, y su capacidad para tolerar condiciones alcalinas también le permite crecer en medios para aislamiento de vibrios. Aunque se trata de un microorganismo aerobio, la *P. aeruginosa* puede utilizar nitrato y arginina como aceptores de electrones y crecer en forma anaerobia. La temperatura óptima de crecimiento es de 35°C, pero puede crecer a 42°C.

La *P. aeruginosa*, (aunque no todas las cepas) es el único bacilo gram negativo que produce piocianina, de color azul oscuro, puede extraerse de la solución acuosa mediante cloroformo. Además de la piocianina, también puede producir otros pigmentos fluorescentes, de color verde amarillento, soluble en agua pero no en cloroformo. Ambos pigmentos son productos de oxidación de precursores incoloros.

La energía resultante de la utilización de los hidratos de carbono es obtenida por metabolismo oxidativo, más que fermentativo. Dado que el ácido producido por la vía oxidativa es menos que el producido por la vía fermentativa, la utilización de hidratos de carbono por parte de la *P. aeruginosa* debe buscarse en medios especiales como el medio O-F de Hugh y Leifson.

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	PRUEBA DE OXIDASA
Agar Cetrinida	Colonias verdes azulosas con luz ultravioleta se observan de color verdoso fluorescente.	Bacilos gram negativos	Positiva
Agar Pseudomonas para obtención de fluoresceína	Colonias incoloras o amarillentas, con luz ultravioleta se observan de color amarillento fluorescente	Bacilos gram negativos	Positiva
Agar para detección de piocina	Colonias verde azulosas. Con luz ultravioleta se observan de color azul fluorescente	Bacilos gram negativos	Positiva

TABLA 7. CARACTERÍSTICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*. (2)

	PRUEBAS BIOQUIMICAS	RESULTADOS
	CITRATO DE KOSEK	+
	CITRATO DE SIMONS	+
TSI	GAS (H ₂)	-
	H ₂ S	-
	FONDO	ALCALINO
	PICO	ALCALINO
	CALDO ROJO FENOL Y MANITOL	-
	SACAROSA (MEDIO O-F)	-
	GLUCOSA (MEDIO O-F)	+
	LACTOSA (MEDIO O-F)	-
SIM	INDOL	-
	H ₂ S	-
	MOVILIDAD	+
RMVP	RM	-
	VP	+
	MIO	-
	INDOFENOL OXIDASA	+
	OXIDACION DE MALTOSA	-
	OXIDACION DE MANITOL	*d
	2-CETOGLUCONATO	*d
	LISINA DECARBOXILASA	-
	ARGININA DIHIDROLASA	+

TABLA 8. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* (17)

*d= variable

MEDIO O-F: Hugh y Leifson

RESISTENCIA: La *P. aeruginosa* es más resistente a la desinfección química que otras bacterias en estado vegetativo. Cuando se les proporciona humedad adecuada, pueden sobrevivir en variedad de lugares, como equipo para atención respiratoria, humidificadores con agua fría, instrumental, pisos, baños y canillas de agua.

Muchos de los antibióticos y antimicrobianos de uso común son inefectivos contra la *P. aeruginosa*. Se han aislados de ciertos tipos de compuestos de amonio cuaternario y de jabones con hexaclorofeno. Los desinfectantes fenólicos y beta-glutaraldehído habitualmente son efectivos.

EPIDEMIOLOGÍA: Las infecciones por *P. aeruginosa* se producen en individuos con defensas alteradas. Estos incluyen pacientes con quemaduras, personas con enfermedades malignas o metabólicas o aquellos que han sido sometidos a operaciones. La frecuencia de infecciones de las vías urinarias es mayor en individuos con edad avanzada.

La naturaleza ubicua de la *P. aeruginosa* incrementa su diseminación. Se encuentra no sólo en los suelos y en el agua, sino también en aproximadamente el 10% de las heces normales y en la piel de algunos individuos normales. La tasa de colonización de pacientes internados aumenta y se ubica entre el 30 y el 60%. Casi cualquier sitio de un medio hospitalario puede alojarse este microorganismo, especialmente si hay humedad. Los equipos de apoyo respiratorio contaminados, catéteres, instrumentos varios, líquidos de infusión endovenosa e incluso en el jabón son vehículos para su diseminación.

PATOGÉNICIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS: La *P. aeruginosa* puede infectar casi cualquier tejido o sitio del cuerpo. Las lesiones localizadas se producen en el sitio de quemaduras o heridas, en el tejido corneal, vías urinarias o pulmones.

La *P. aeruginosa* también puede causar endocarditis bacteriana y gastroenteritis. La infección del tejido corneal puede dar como resultado la pérdida del ojo. Desde una infección localizada, los microorganismos pueden diseminarse por vía hematogena, produciendo una septicemia y lesiones focales en otros tejidos.

TRATAMIENTO: Muchos agentes antimicrobianos son inefectivos para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. La mayoría de las cepas son susceptibles a ampicilina, gentamicina, tobramicina y colistina, pero se desarrollan formas resistentes, especialmente en tratamientos prolongados. Aproximadamente el 50% de las *P. aeruginosa* son sensibles a la carbenicilina y ticarcilina. El derivado de sulfonamida, sulfamilón, cuando es aplicable tópicamente, limita la densidad bacteriana en quemaduras e impide la diseminación de los microorganismos hacia otros sitios del cuerpo.

Otro enfoque en el tratamiento por *P. aeruginosa* ha sido el uso de las vacunas. Una de estas, una vacuna heptavalente, reduce la mortalidad del 15 al 35% en pacientes quemados. Otra vacuna, PEV-01, también ha sido usada en un estudio prospectivo con pacientes quemados. La gammaglobulina hiperinmune también puede ser útil en el tratamiento con pacientes de enfermedad neoplásica e infecciones por *P. aeruginosa*. (12,13,14)

Salmonella sp

Es un bacilo gramnegativo, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. no fermentan lactosa, muchas son móviles y producen ácido sulfhídrico de tiosulfato y gas de la fermentación de glucosa. Las salmonelas son capaces de tolerar concentraciones relativamente altas de bilis. Para su aislamiento se utilizan medios selectivos que contienen inhibidores químicos tales como verde brillante, desoxicolato, selenito, tetrationato y citrato.

Infectan a muchas especies animales además del hombre y son capaces de invadir tejidos extraintestinales.

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
Agar verde brillante	colonias pequeñas transparentes incoloras rosas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja.	Bacilos gram negativos
Agar xilosa-lisina desoxicolato	Colonias que no modifican el medio, rojas con o sin centro negro	Bacilos gram negativos
Agar sulfito bismuto	Colonias negras o verdes	Bacilos gram negativos
Agar fierro triple azúcar	Superficie alcalina (roja) picadura ácida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfúrico (negro).	Bacilos gram negativos

TABLA 9. CARACTERÍSTICAS DE *Salmonella sp.* (2)

PRUEBAS BIOQUIMICAS		RESULTADOS
	CITRATO DE KOSEK	+
	CITRATO DE SIMONS	-
TSI	GAS (H ₂)	+
	H ₂ S	+
	FONDO	ACIDA
	PICO	ALCALINO
	CALDO ROJO FENOL Y MANITOL	-
	SACAROSA	-
	GLUCOSA	-
	LACTOSA	-
SIM	INDOL	-
	H ₂ S	+
	MOVILIDAD	+
RMVP	RM	+
	VP	-
	MIO	+
	UREASA	-
	LISINA	+
	FENIL	-
	ALANINA	-

TABLA 10. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA *Salmonella* sp. (17)

MANIFESTACIONES CLÍNICAS: La enfermedad causada por salmonela puede presentarse de la siguiente manera; una gastroenteritis, septicemia, Salmonelosis.

GASTROENTERITIS: La gastroenteritis por Salmonella, representa una infección real del intestino y por lo general ocurre aproximadamente a las 28 hrs. después de la ingestión del microorganismo. La enfermedad se caracteriza por diarrea, fiebre y dolor abdominal que habitualmente es autolimitado y dura de 2 a 5 días. En muchos casos, los individuos infectados no buscan atención médica. La deshidratación y el desequilibrio electrolítico constituyen las mayores amenazas en los niños pequeños y en los ancianos. Aunque el microorganismo puede ser aislado de las heces durante varias semanas, la aparición de portadores crónicos que eliminan el microorganismo después de un año es rara. Cualquier salmonela puede producir la enfermedad, pero la cepa más común es la *S. enteritidis* serotipo typhimurium.

SEPTICEMIA: La septicemia por Salmonella es prolongada y se caracteriza por fiebre, escalofríos y anemia. Pueden desarrollarse lesiones focales en cualquier tejido, produciendo osteomielitis, neumonía, abscesos pulmonares, meningitis o endocarditis. La gastroenteritis es leve o está ausente, y rara vez se aísla el microorganismo de las heces. En este tipo de enfermedad con frecuencia se aísla *S. cholerae-suis*.

SALMONELOSIS: Como con la fiebre tifoidea, los alimentos y agua contaminados son los mecanismos de transmisión de otros tipos de salmonelas. En contraste con la fiebre tifoidea, en la cual el portador humano es la única fuente de contaminación, los animales y productos de animales contaminados representan la principal fuente de otras salmonelosis.

CONTROL: la prevención de la salmonelosis requiere un estricto control del agua y que los alimentos sean apropiadamente cocinados y/o refrigerados. Temperaturas por debajo de +15°C detienen la proliferación en los alimentos, mientras que aquellas por encima de 52°C destruyen los microorganismos.

La detección y tratamiento de los portadores, particularmente de *S. typhi*, constituye un importante mecanismo de control. No debe permitirse que personas que eliminan microorganismos manipulen alimentos.

Se han provado diversas vacunas para el control de la fiebre. La más prometedora es una vacuna oral que consiste en múltiples dosis de *S. typhi* Ty21a atenuada administrada en una solución de bicarbonato.

Dixon y otros han demostrado que el tratamiento antibiótico de la gastroenteritis no complicada sólo sirve para prolongar y puede ayudar a promover la resistencia a drogas de las salmonelas. El tratamiento debe centrarse en el sostén y la prevención de la deshidratación y desequilibrio electrolítico.

En el caso de la fiebre entérica o septicemia, la ampicilina o el cloranfenicol son las drogas de elección. Sin embargo en 1972, una epidemia en México fue causada por una cepa de *S. typhi* resistente al cloranfenicol. También se observa resistencia a la ampicilina en algunos microorganismos aislados. La combinación de trimetropina-sulfametoxazol ha demostrado ser eficiente en el tratamiento de estas infecciones. La amoxicilina oral, un análogo de la ampicilina, también es eficiente en el tratamiento de la fiebre tifoidea. (15,16,17)

6.0 ANTIÁCIDOS GÁSTRICOS

ANTIÁCIDO: Se denomina antiácido gástrico a aquellos Fármacos que ingeridos son capaces de reaccionar con el ácido clorhídrico neutralizándolo y disminuyendo así la acidez gástrica. (18)

ANTIÁCIDO IDEAL: las condiciones que debe reunir un antiácido gástrico ideal se mencionan a continuación.

- a) Debe producir una neutralización inmediata y prolongada del ácido clorhídrico llevando el pH desde 1.0 a 2.0 a uno de 3.0 a 4.0-desaparición del ácido clorhídrico libre.
- b) Debe tener una aceptación prolongada por el paciente, en lo que se refiere especialmente al sabor.
- c) No ha de producir efectos generales tóxicos, como la alcalosis.
- d) La acción debe de estar destinada al tracto gastrointestinal, es decir que debe de absorberse poco o no absorberse.
- e) No ha de interferir con los procesos digestivos.
- f) No debe producir constipación, diarrea ni formación de gas.
- g) No ha de producir el fenómeno de "rebote" secreción gástrica excesiva, lo que sucede cuando el pH se eleva a mas de 5.
- h) Debe ser económico, ya que se trata de un tratamiento a largo plazo, generalmente.

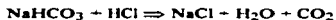
CLASIFICACIÓN: El descenso de acidez puede realizarse en dos formas principales:

a) Por neutralización del ácido clorhídrico con sustancias alcalinas que dan lugar a sales neutras, en cuyo caso el pH del jugo gástrico, de 1.0 a 2.0 puede elevarse a 7.0 y aun más, si el compuesto es alcalino y soluble, y se administra en exceso. Estas drogas solubles y absorbibles son capaces de aumentar la reserva alcalina de la sangre y producir así alcalosis metabólica. Son de acción rápida y corta, por lo que se les denomina antiácidos sistémicos o agentes alcalóticos.

b) Otros forman compuestos no absorbibles que no alteran el equilibrio ácido-base del organismo, producen efectos prolongados, y no provocan alcalosis, por lo que se les denomina antiácidos locales o no sistémicos. (18)

ANTIÁCIDOS GÁSTRICOS SISTÉMICOS O AGENTES ALCALÓTICOS

Ingerido, el bicarbonato de sodio, sal alcalina, se combina con el ácido clorhídrico gástrico neutralizándose de la siguiente manera:



Se administra en exceso lleva el pH gástrico hasta 8.3, alcalino, por lo que se produce inactivación de la pepsina. Como es una sustancia soluble, la neutralización ácida es inmediata se produce un pronto alivio de los síntomas provocados por la hiperacidez gástrica; por lo mismo la duración de los efectos es corta y el exceso pasa al intestino, donde es absorbido. La elevación del pH gástrico estimula la secreción gástrica, produciéndose así un fenómeno de rebote.

La reacción química producida en el estomago provoca el desprendimiento de dióxido de carbono, que irrita ligeramente la mucosa gástrica y distiende el estomago, produciéndose por vía refleja el eructo con eliminación de gases, la misma distensión contribuye al fenómeno de rebote. (18,19)

ANTIÁCIDOS GÁSTRICOS LOCALES O NO SISTÉMICOS

Estas sustancias son de origen mineral o sintético y corresponden a compuestos insolubles de aluminio calcio y magnesio.

HIDRÓXIDO DE ALUMINIO: Reacciona con el ácido clorhídrico de la siguiente



CARBONATO DE CALCIO: Reacciona con el ácido clorhídrico de la siguiente forma:



HIDRÓXIDO DE MAGNESIO: Reacciona con el ácido clorhídrico de la siguiente



ACCIÓN FARMACOLÓGICA. Se trata de antiácidos gástricos, sin acción sistémica o general, sino local a nivel del tracto gastrointestinal.

ACCIÓN EN EL ESTOMAGO: Ingeridas estos fármacos, se combinan con el ácido clorhídrico del estomago, produciendo neutralización total o parcial. Son sustancias insolubles y se solubiliza a medida que reaccionan con el ácido clorhídrico, por lo que sus efectos son algo lentos pero sobre todo prolongados. Todo exceso del antiácido no se disuelve y el pH gástrico nunca pasa de la neutralidad. En esta forma se alivian los síntomas de la hiperclorhidria y de la ulcera gastroduodenal, como el ardor y dolor epigástrico. Pero dicho pH siempre resulta mayor que el del jugo gástrico y si aumenta a más de 5.0 se produce un ulterior estímulo de la secreción gástrica debido a la elevación del pH que se denomina fenómeno de rebote, que se produce prácticamente con todos los antiácidos en mayor o menor proporción, como se ha comprobado.

ULCERA GASTRODUODONAL O PÉPTICA: Dado el papel agresivo del ácido clorhídrico y de la pepsina en la úlcera gastroduodenal, la neutralización ácida realizada por los antiácidos gástricos posee un papel protector frente a la acidez y al aumentar el pH disminuye la acción proteolítica de la pepsina, cuya actividad máxima es a pH 2, mientras que a pH 5, casi no posee actividad péptica. En esta forma, los antiácidos suprimen la sintomatología ulcerosa, alivian el dolor y favorecen la curación de la úlcera.

ACCIÓN EN EL INTESTINO: En el caso de los compuestos de magnesio, el cloruro de magnesio formado cuando llega al intestino en exceso, siendo una sal soluble y poco absorbible por retención de agua puede actuar como purgante y provocar diarrea. En cambio el carbonato de calcio, para el caso de los compuestos de calcio, siendo insolubles forman una capa sobre la mucosa intestinal, por lo que tienden a producir constipación y puede así contrarrestar la acción purgante de los compuestos de magnesio. Por la misma razón, los compuestos de aluminio son constipantes, pero aquí se agrega y es importante la acción astringente del cloruro de aluminio formado en exceso, de manera que la constipación puede ser acentuada; por eso es conveniente usar el hidróxido de aluminio junto con compuestos de magnesio para contrarrestar la acción constipante del primero. (18,19)

7.0 MATERIAL Y MÉTODO

7.1 MATERIAL

MARCA

Asa de platino

Algodón

Barras magnéticas

Botellas de dilución de leche

Cajas petri desechables estériles de 100 x 15 mm

Cubreobjetos

Espátula

Frascos de plástico de 250 ml

Gradilla

Matraz aforado de 250 ml

Matraz aforado de 500 ml

Matraz erlenmeyer de 250 ml

Matraz erlenmeyer de 500 ml

Matraz balón de fondo plano de 1000 ml

Matraz balón de fondo plano de 2000 ml

Mechero fisher

Perilla

Pipetas graduadas de 1 ml

Pipetas graduadas de 5 ml

Pipetas graduadas de 10 ml

Pipetas Pasteur

Portaobjetos

Portapipetas

Probetas de 100 ml

Kimax

Pyrex

Pyrex

Pyrex

Pyrex

Kimax

Kimax

Kimax

Kimax

Kimax

Kimax

Pyrex

Tapones de acero inoxidable

Tapones de rosca

Tela de asbesto

Tira indicadora

Triplie

Tubos de ensaye de 10 x 6, 25 x 15, 15 x 15 mm

Vasos de precipitado de 250 ml

Vasos de precipitados de 500 ml

Kimax

Pyrex

Pyrex

7.2 REACTIVOS

Ácido clorhídrico

Alcohol

Boffer pH 4.0

Boffer pH 11.0

Cloruro de sodio

Cristal violeta

2,3,5-Cloruro de trifenil tetrazolium

Hidróxido de sodio

Hidróxido de potasio

Indicador rojo de metilo

Lecitina

Lugol

α - naftol

Oxalato de amonio

Reactivo de Erlic

Safranina

Tween

Yodo

Yoduro de potasio

PROVEEDOR

J.T Baker

La Proveedora

Merck

Merck

J.T Baker

J.T Baker

J.T Baker

Proquifarma

J.T Baker

Proquifarma

J.T Baker

7.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Escherichia coli ATCC 10536

Ps.aeruginosa ATCC 9027

Salmonella thyphimurium ATCC 13311

Tiras de indicadores biológicos conteniendo esporas de Bacillus stearothermophilus

7.4 EQUIPO

Autoclave

Balanza granataria

Campana de flujo laminar

Cuenta colonias

Horno

Incubadora

potenciómetro

Refrigerador

Agitador

MARCA

Asmed

Ohaus

Veco

Elecsa

Thelco

Thelco

Metrohm 632

Wirlpool

Thermoline

7.5 INSTRUMENTOS

Espectrofotómetro

MARCA

Perkin Elmer λ 3A uv/vis

7.6 MEDIOS DE CULTIVO**MARCA**

Caldo Citrato de Simons	Bioxon
Caldo Citrato de Koser	Bioxon
Caldo Dextrosa	Bioxon
Caldo Lactosa	Bioxon
Caldo Peptona de Lecitina con Soja	Bioxon
Caldo Rojo Fenol y Manitol	Bioxon
Caldo Rojo de Metilo Vogues Proskauer	Merck
Caldo Sacarosa	Bioxon
Caldo Selenito	Bioxon
Caldo Soya Trypticaseina	Merck
Caldo Tergitol	Bioxon
Agar Eosina- azul de Metileno	Difco
Agar FLO	Bioxon
Agar Hierro Triple Azucar	Merck
Agar MIO	Bioxon
Agar Nutritivo	Bioxon
Agar Soya Trypticaseina	Merck
Agar Sal Manitol	Merck
Agar SIM	Bioxon
Agar Verde Brillante	Bioxon

7.7 MÉTODO

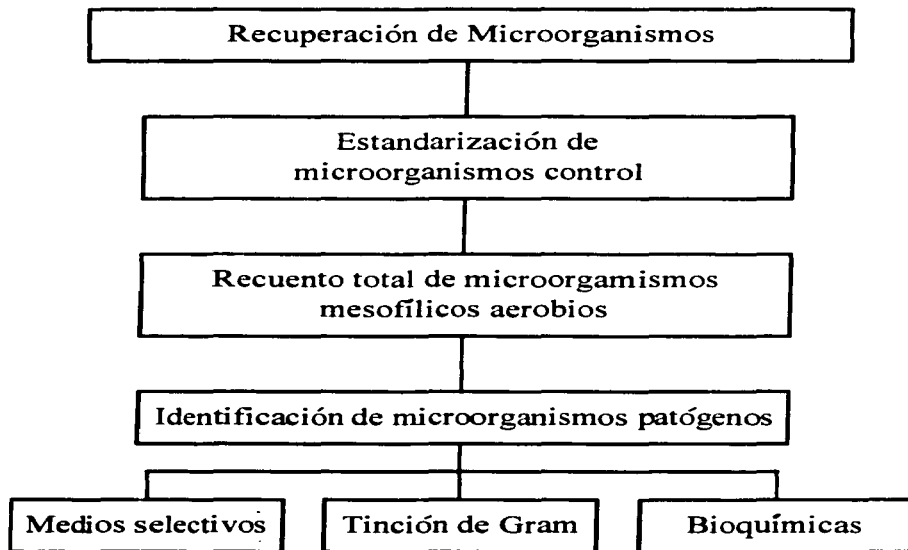


DIAGRAMA 1. METODOLOGÍA GENERAL DE VALIDACIÓN

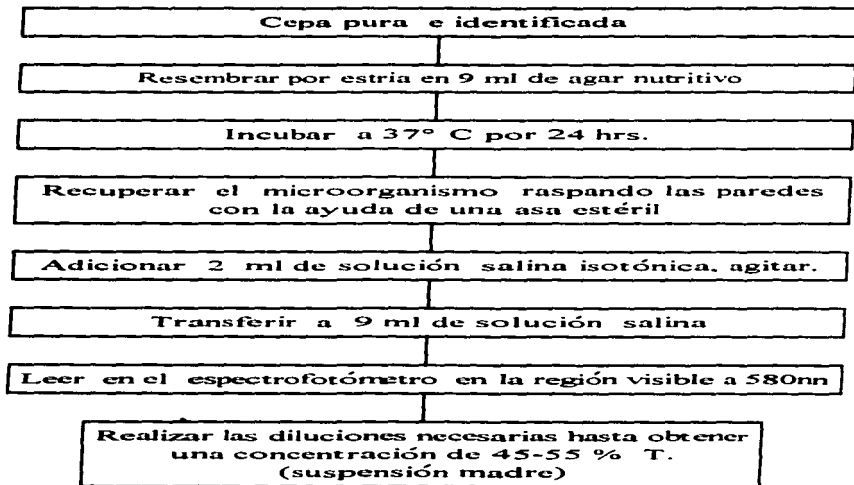
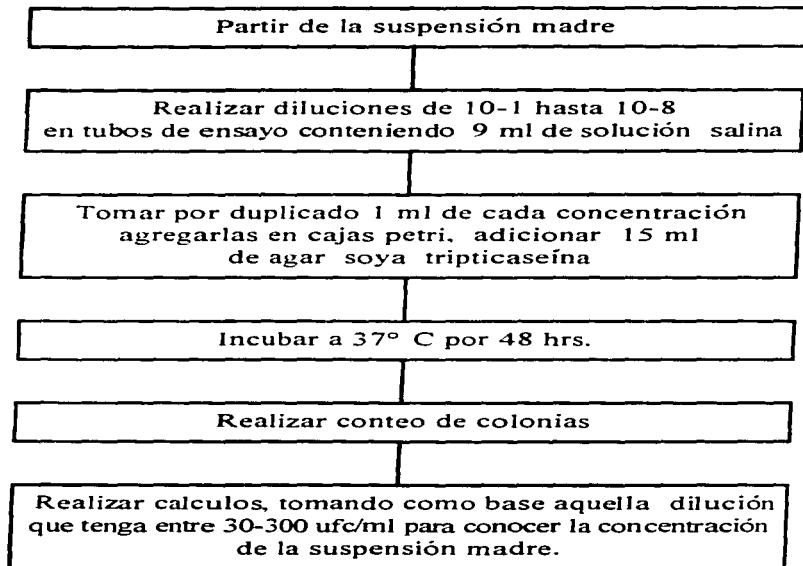


DIAGRAMA 2. RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTROL

**DIAGRAMA 3. ESTANDARIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTROL**

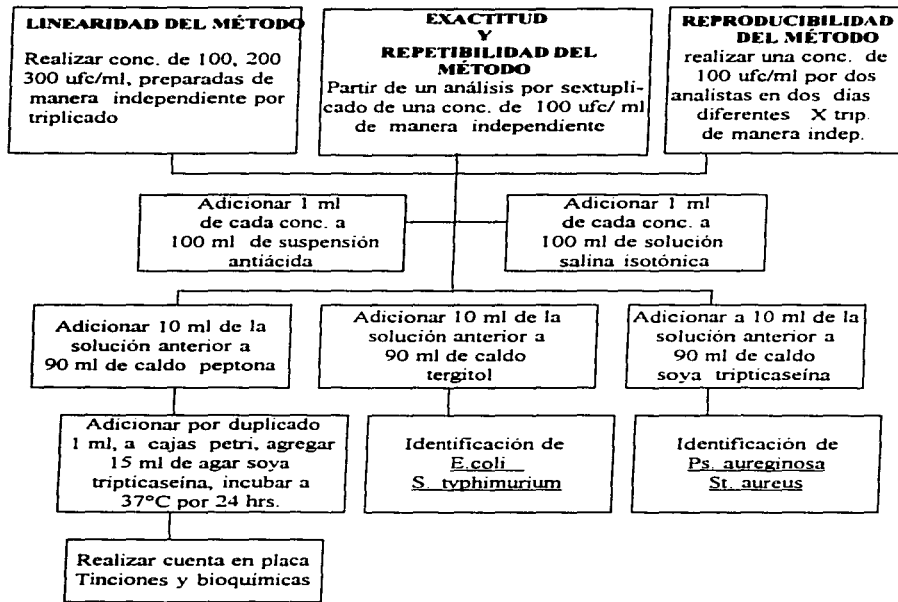


DIAGRAMA 4. RECUENTO DE MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS Y PARÁMETROS REALIZADOS EN LA VALIDACIÓN

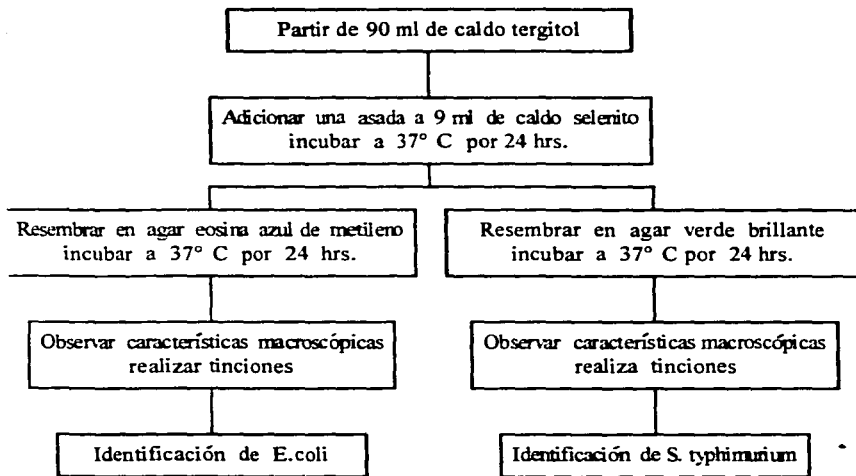


DIAGRAMA 5. IDENTIFICACIÓN DE E.coli y S. typhimurium

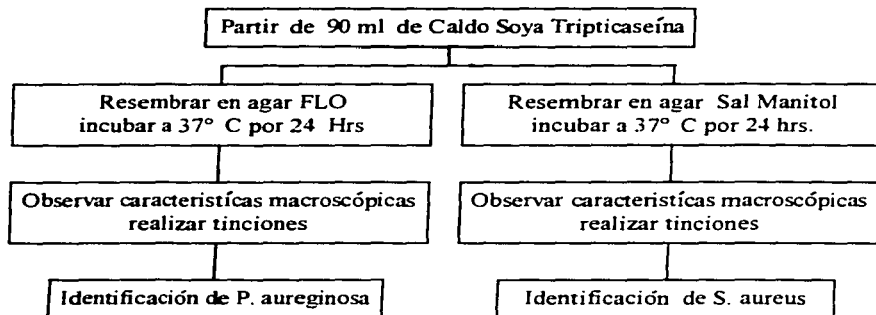


DIAGRAMA 6. IDENTIFICACIÓN DE P. aureginosa y S. aureus

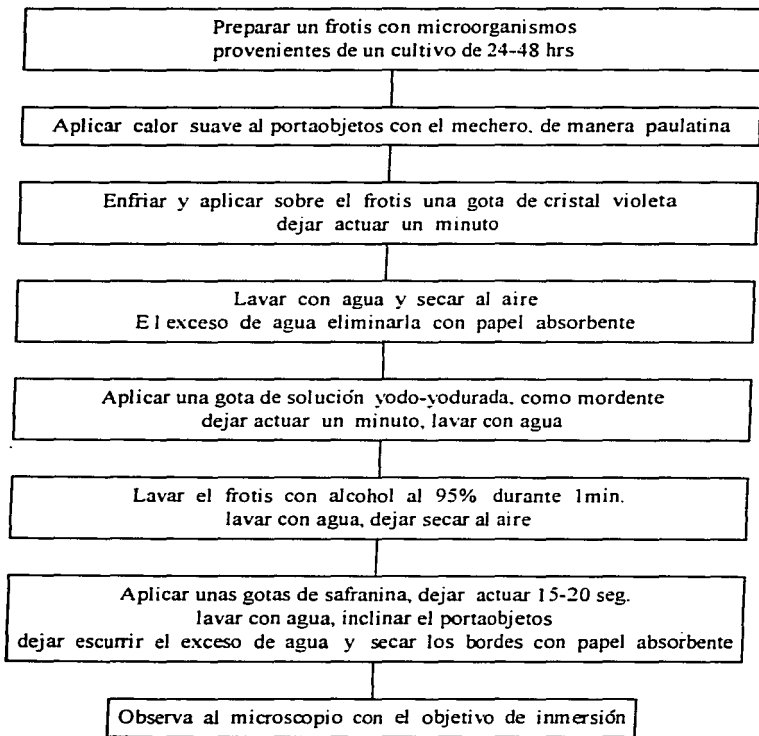


DIAGRAMA 7. TINCIÓN DE GRAM

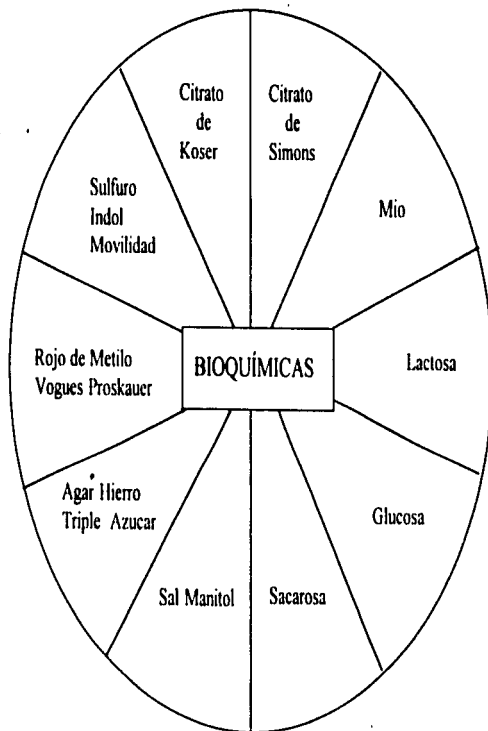


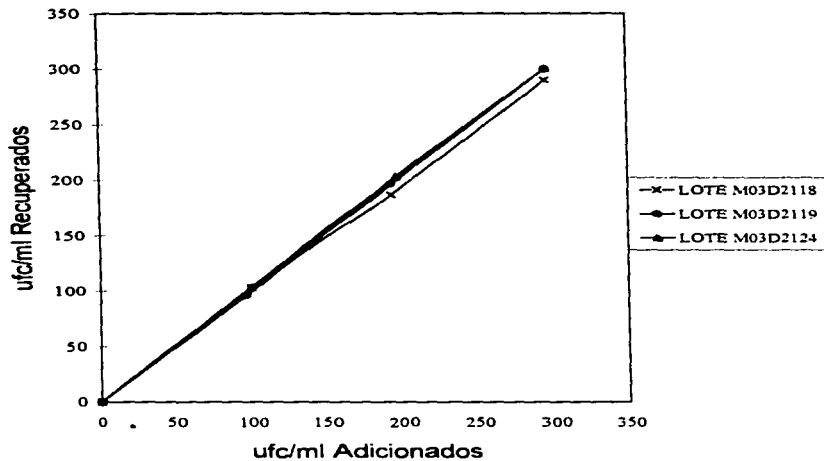
DIAGRAMA 8. BIOQUÍMICAS
REALIZADAS EN LA VALIDACIÓN

8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

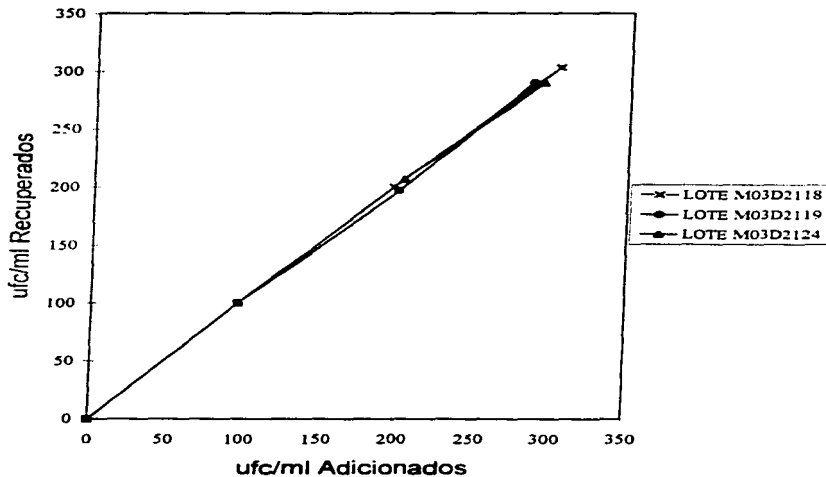
8.1 LINEARIDAD DEL MÉTODO

LOTE	CANTIDAD ADICIONADA (ufc/ml)			CANTIDAD RECUPERADA (ufc/ml)			% DE RECOBRO		
	E.coli	Ps.aeru ginosa	S.typhi munum	E.coli	Ps.aeru ginosa	S.typhi munum	E.coli	Ps.aeru ginosa	S.typhi munum
M 0 3 D 2 1 1 8	100	100	110	100	110	120	100	110	109.09
	100	90	100	110	90	100	110	100	100
	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	190	190	170	180	200	170	94.73	105.26	100
	190	200	190	180	190	180	94.73	95	94.73
	200	200	170	200	210	170	100	105	100
	280	300	270	280	290	270	100	96.66	100
	300	310	270	290	310	260	96.66	100	96.29
	310	300	270	300	310	270	96.77	103.33	100
M 0 3 D 2 1 1 9	100	100	100	110	100	110	110	100	110
	90	90	100	90	90	100	100	100	100
	100	100	90	100	110	90	100	110	100
	200	200	200	200	200	200	100	100	100
	190	210	190	200	200	200	105.26	95.23	105.26
	190	190	190	190	190	190	100	100	100
	290	290	270	290	290	280	100	100	103.70
	300	280	290	310	290	300	103.33	103.57	103.44
	300	290	300	300	290	300	100	100	100
M 0 3 D 2 1 2 4	100	100	90	100	110	90	100	110	100
	100	90	100	110	90	100	110	100	100
	100	100	90	100	100	90	100	100	100
	200	200	200	200	200	200	100	100	100
	200	210	200	210	220	210	105	104.76	105
	190	200	180	200	200	190	105.26	100	100
	300	280	300	310	280	300	103.33	100	100
	290	300	290	290	300	300	100	100	103.44
	300	300	300	300	290	300	100	100	100

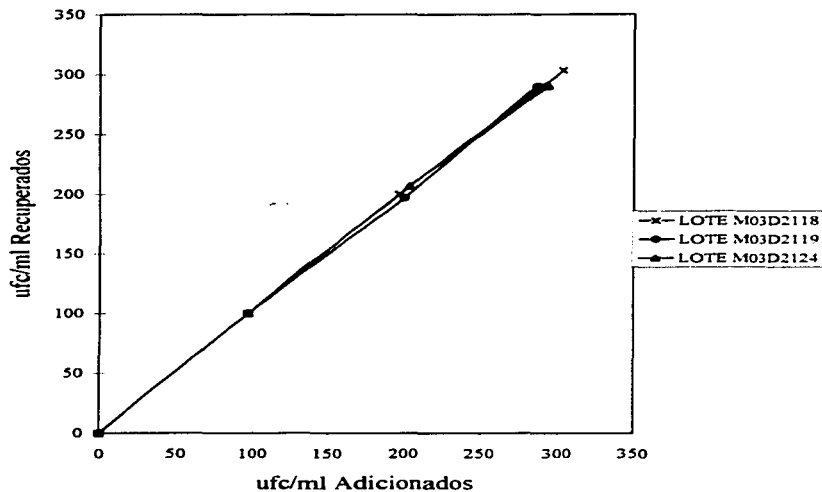
TABLA 11. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA LINEARIDAD DEL MÉTODO



GRÁFICA 1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA *E. coli*



GRÁFICA 2. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA *Ps. aeruginosa*



GRÁFICA 3. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA *S. typhimurium*

PARAMETRO EVALUADO	VALOR TEORICO	VALOR EXPERIMENTAL								
		E coli			Ps. aeruginosa			S typhimurium		
		LOTE			LOTE			LOTE		
		M03D 2118	M03D 2119	M03D 2124	M03D 2118	M03D 2119	M03D 2124	M03D 2118	M03D 2119	M03D 2124
Pendiente (b)	~ 1	0 9488	1 0005	0 9980	0 9832	0 9970	0 9679	0 9605	1 0148	0 9985
Ordenada al Origen (a)	~ 0 00	6 7349	3 2250	4 4822	5 5565	4 4897	7 4535	6 1295	1 5969	0 6336
Coficiente de correlación (r)	≥ 0 99	0 9976	0 9983	0 9980	0 9957	0 9965	0 9979	0 9971	0 9981	0 9985
Coficiente de determinación(r ²)	≥ 0 98	0 9952	0 9966	0 9960	0 9914	0 9930	0 9958	0 9942	0 9962	0 9970
Coficiente de Variación (CV)	≤ 5%	4 6671	3 4701	3 4782	4 5869	4 2073	3 8136	3 9391	3 4052	2 3583
t _(n-2) g.l= 9 para (b)	2 3646	-0 3964	0 0036	-0 0014	-0 1235	-0 1714	-0 2440	-0 3008	0 1075	0 1005
t _(n-2) g.l= 9 para (a)	2 3646	0 2453	0 1122	0 1547	0 1891	0 1586	0 2653	0 2385	0 0559	0 0218
DE	≤ 5%	4 6302	3 5418	3 5693	4 6646	4 2329	3 8620	3 9396	3 4899	2 3950
%R	95-105%		94 73 - 110%		95 - 110%		94 73 - 110%			

TABLA 12. PARAMÉTROS ESTADÍSTICOS EN LA LINEARIDAD DEL MÉTODO

PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTEHo: $b = 1$ Ha: $b \neq 1$ **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**Si $t_{\alpha/2} < t^* \text{ exp.} < t_{1-\alpha/2} \Rightarrow$ Ho No se Rechaza* En la tabla No 12 están indicadas las $t^* \text{ exp.}$ para cada microorganismo y del lote correspondiente**PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA LA ORDENADA AL ORIGEN**Ho: $a = 0$ Ha: $a \neq 0$ **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**Si $t_{\alpha/2} < t^* \text{ exp.} < t_{1-\alpha/2} \Rightarrow$ Ho No se Rechaza* En la tabla No 12 están indicadas las $t^* \text{ exp.}$ para cada microorganismo y del lote correspondiente

LOTE	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%					
	PENDIENTE			ORDENADA AL ORIGEN		
	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aerugi- nosa</i>	<i>S. typhimu- rium</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aerugi- nosa</i>	<i>S. typhimu- rium</i>
M0	0.6434	0.6617	0.6500	-58.1845	-63.9001	-54.6293
3D	< 1	< 1	< 1	< 0	< 0	< 0
21	< 1.2519	< 1.3046	< 1.2709	< 71.6543	< 75.0131	< 66.8883
18						
M0	0.6800	0.6598	0.6893	-64.7006	-62.4467	-19.2566
3D	< 1	< 1	< 1	< 0	< 0	< 0
21	< 1.3209	< 1.2941	< 1.3402	< 71.1506	71.4261	22.4504
19						
M0	0.6790	0.6568	0.6894	-63.8908	-58.9759	-67.9827
3D	< 1	< 1	< 1	< 0	< 0	< 0
21	< 1.3205	1.2789	1.3381	72.8552	73.8829	69.2499
24						

TABLA 13. INTERVALO DE CONFIANZA EN LA LINEARIDAD DEL MÉTODO

Como se puede observar en los resultados obtenidos, se encontró que existía una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada para cada microorganismo y lote de suspensión antiácida utilizadas respectivamente, esto se comprobó mediante la gráfica realizada, ya que en ambos casos se obtuvo una línea recta.

En el tratamiento estadístico evaluado se puede observar un coeficiente de determinación mayor a 0.98 ($\bar{X} = 0.9950$), un coeficiente de variación de 2.3586 - 4.6671 (menor de un 5%), una pendiente de la recta muy cercana a 1 (0.9488 - 1.0141).

La t exp. obtenida para la ordenada al origen y la pendiente se encontró en el rango -0.3964 - 0.2653, mientras que la t tab. obtenida es (2.3646) aunque la ordenada al origen no cae dentro de especificaciones que es 0 (0.6336 - 7.4535), ni el % de recobro que fue de 94.73-110%, (95-105%). Se puede concluir que el método es lineal ya que el intervalo de confianza al 95% se encuentra en el rango de aceptación para la pendiente y la ordenada al origen.

8.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

LOTE	CANTIDAD ADICIONADA (ufc/ml)			CANTIDAD RECUPERADA (ufc/ml)			% DE RECOBRO		
	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
M									
0	100	120	100	100	110	100	100	91.66	100
3	90	110	100	90	100	100	100	90.90	100
D	100	100	110	100	100	120	100	100	109.09
2	100	100	110	100	100	120	100	100	109.09
1	90	90	110	90	90	120	100	100	109.09
1	100	100	100	90	100	100	90	100	100
8									
M									
0	100	120	100	90	110	100	90	91.66	100
3	100	100	110	100	100	120	100	100	109.09
D	100	100	110	100	100	120	100	100	109.09
2	100	100	110	100	100	120	100	100	109.09
1	90	100	100	90	100	100	100	100	100
1	100	110	100	100	100	100	100	90.90	100
9									
M									
0	120	90	110	110	90	91.66	100	100	90.90
3	120	90	110	110	90	91.66	100	100	90.90
D	100	90	110	100	90	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	90	100	90	90	100	100	100	100	100
2	90	100	100	100	110	100	110	110	100
4									

TABLA 14. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD

LOTE	E.coli			Ps. aeruginosa			S. typhimurium		
	%R*	DE	CV	%R*	DE	CV	%R*	DE	CV
M03D 2118	98.3333	4.0824	4.151	97.0933	4.5093	4.6442	104.54	4.9787	4.7623
M03D 2119	98.3333	4.0824	4.1516	97.033	4.5093	4.6442	104.54	4.9787	4.7623
M03D 2124	97.22	4.3067	4.4298	101.666	4.0824	4.0155	96.966	4.6992	4.8462

TABLA 15. PARAMETROS ESTADISTICOS DE LA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

HIPOTESIS DE CONTRASTE PARA LA EXACTITUD

$H_0: \mu = 100\%$

$H_a: \mu \neq 100\%$

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

$t \leq t_{\alpha/2} \leq t_{exp.} \Rightarrow H_0$ No se Rechaza

LOTE	ÁREA DE ACEPTACION			INTERVALO DE CONFIANZA 95%		
	E.coli	Ps. aerugi- nosa	S. typhimu- rium	E.coli	Ps. aerugi- nosa	S. typhimu- rium
M0	-2.5706	-2.5706	-2.5706	94.0490	92.3610	99.3201
3D	< -1.00	< -1.5789	< 2.2361	< 100.00	< 100.0	< 100
21	< 2.5706	< 2.5706	< 2.5706	102.6175	< 100.7830	109.7698
18						
M0	-2.5706	-2.5706	-2.5706	94.0490	92.3610	99.3201
3D	< -1.00	< -1.5789	< 2.2361	< 100.0	< 100.0	< 100.00
21	< 2.5706	< 2.5706	< 2.5706	< 102.6175	< 101.8255	< 109.7698
19						
M0	-2.5706	-2.5706	-2.5706	92.7003	84.1765	92.0350
3D	< -1.5811	< 0.9999	< -1.5811	< 100.0	< 100.0	< 100.0
21	< 2.5706	< 2.5706	< 2.5706	< 101.7396	< 119.1568	101.8981
24						

TABLA 16. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA EXACTITUD

HIPÓTESIS DE CONTRASTE PARA LA REPETIBILIDADHo: $\sigma^2 \leq 5\%$ Ha: $\sigma^2 > 5\%$ **CRITERIO DE ACEPTACIÓN** $\chi^2 (\alpha/2) < \chi^2_{exp.} < \chi^2 (1-\alpha/2)$

LOTE	ÁREA DE ACEPTACIÓN			INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%		
	E.coli	Ps.aeruginosa	S.typhimurium	E.coli	Ps.aeruginosa	S.typhimurium
MO						
3D	0.831	0.831	0.831	6.4939	1.7570	9.6584
21	< 3.3331	< 4.0667	< 4.9574	< 25	< 25	< 25
18	< 12.832	< 12.832	< 12.832	< 100.2767	< 27.1737	< 149.1423
MO						
3D	0.831	0.831	0.831	6.4939	7.9230	9.6584
21	< 3.3331	< 4.0667	< 4.9574	< 25	< 25	< 25
19	< 12.832	< 12.832	< 12.832	< 100.2767	< 122.3452	< 148.1423
MO						
3D	0.831	0.831	0.831	7.2271	6.4939	8.6044
21	< 3.7095	< 3.3331	< 4.4161	< 25	< 25	< 25
24	< 12.832	< 12.832	< 12.832	< 111.5984	< 100.2767	< 132.8669

TABLA 17. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA REPETIBILIDAD

Como se puede observar los resultados obtenidos en la exactitud y repetibilidad del método son los siguientes: la media de los % de recobro caen dentro de límites establecidos (95-105%), estando dentro del intervalo 96.66 - 104.54%, al igual que el coeficiente de variación ($\leq 5\%$), encontrándose entre 4.0155-4.8462, mientras que la $t_{exp.}$ es de -1.5811 -2.2361 para la exactitud, y la σ^2 para la repetibilidad esta en el intervalo de 3.33 - 4.9574 ($< 5\%$) ambos resultados se encuentran dentro del área de aceptación por lo cual se puede concluir que el método es exacto y repetible.

8.3 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

LOTE	DIAS	E. coli		Ps. aeruginosa		S. typhimurium	
		ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2
		M03D2118	DIA 1	100.00%	90.00%	90.00%	100.0%
		100.00%	100.0%	100.0%	90.00%	100.00%	109.09%
		100.00%	100.0%	90.00%	90.00%	100.00%	111.11%
	DIA 2	100.00%	100.00%	90.00%	100.0%	109.09%	100.00%
		91.66%	100.00%	100.0%	90.00%	109.09%	109.09%
		91.66%	91.66%	90.00%	90.00%	100.00%	111.11%
M03D2119	DIA 1	109.09%	110.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		109.09%	100.00%	100.00%	100.00%	109.09%	100.00%
		109.09%	100.00%	90.90%	90.90%	100.00%	110.00%
	DIA 2	100.00%	100.00%	91.66%	100.00%	100.00%	110.00%
		110.00%	110.00%	91.66%	91.66%	109.09%	100.00%
		110.00%	109.09%	100.00%	100.00%	109.09%	100.00%
M03D2124	DIA 1	100.00%	90.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
		100.00%	100.00%	90.90%	90.00%	100.00%	100.00%
		91.66%	90.00%	90.90%	90.90%	100.00%	100.00%
	DIA 2	91.66%	91.66%	91.66%	91.66%	100.00%	110.00%
		91.66%	90.00%	90.90%	90.00%	100.00%	109.09%
		100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	109.09%	100.00%

TABLA 18. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

LOTE	E. coli		Ps. aeruginosa		S. typhimurium	
	DE	CV	DE	CV	DE	CV
M03D2118	4.3324	4.4620	4.5226	4.8893	5.0308	4.7622
M03D2119	4.9614	4.6981	4.4581	4.6246	4.8000	4.6925
M03D2124	4.7066	4.9690	4.5651	4.8644	4.2541	4.1565

TABLA 19. PARAMETROS ESTADÍSTICOS PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS			MEDIA DE CUADRADOS			F. CALCULADA			F. TABLAS
		<u>E. coli</u>	<u>Ps. aeruginosa</u>	<u>S. typhimurium</u>	<u>E. coli</u>	<u>Ps. aeruginosa</u>	<u>S. typhimurium</u>	<u>E. coli</u>	<u>Ps. aeruginosa</u>	<u>S. typhimurium</u>	
ANALISTA	M03D2118	0,2296	8,3333	14,36	0,2296	8,3333	14,36	0,009	1	2,08	38,51
	M03D2119	6,8856	5,7963	4,4044	6,8856	5,7963	4,404	0,961	1,198	0,639	
	M03D2124	14,785	0,27	8,3333	14,785	0,27	8,3333	2,453	2,806	0,223	
DIA	M03D2118	46,829	16,6666	13,77	23,414	8,3333	6,88	1,175	0,333	0,22	6,061
	M03D2119	14,323	9,6723	13,77	7,61	4,483	6,88	0,229	0,19	0,226	
	M03D2124	12,051	0,1925	74,5	6,025	0,0962	67,25	0,2223	0,003	2,564	
ITERACIÓN DIA-ANALISTA	M03D2118	0,0007	0	0,000758	0,0007	0	0,007758	0,00003	0	0,000248	7,57
	M03D2119	28,9142	0,000033	0,001758	28,9142	0,000033	0,001758	0,927036	0,000001	0,000057	
	M03D2124	0,00106	0,000033	0,00311	0,00106	0,000033	0,00311	0,00003	0,000001	0,000214	
ERROR	M03D2118	159,4	200	250,2	19,92	25	31,28				
	M03D2119	249,57	203,15	243,5	31,19	25,39	30,43				
	M03D2124	216,84	224,83	116,2	27,1	28,1	14,52				

TABLA 20. ANALISIS DE VARIANZA DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Los resultados obtenidos en la reproducibilidad del método se puede observar que se obtuvieron % de recobros de 90-110% los cuales se encuentran fuera de los especificados (95-105%), mientras que el C.V se encuentra entre 4.1565- 4.9690, quedando dentro de especificaciones ($\leq 5\%$).

En la tabla de analisis de varianza se puede observar que para todos los microorganismos y de cada lote diferente se obtuvo una F calc. para los analistas de 0.009- 2.806 siendo la F tab de 38.51, mientras que las F cal. para los dias son de 0.003-2.564, teniendo una F tab. de 6.061, en la interacción analista-día se obtuvo una F cal. entre 0-0.0000011, con una F tab. de 7.57 por lo tanto se puede observar que no existe interacción analista-día, en ambos casos las F cal. cae dentro de los rangos de F tab. Por lo que se puede concluir que el método microbiológico es reproducible por los dos analistas en los dos días diferentes.

La variabilidad existente entre los resultados obtenidos de un microorganismo a otro así como de los lotes utilizados es pequeña, y esta se puede atribuir principalmente a los errores de tipo personales como son: al pipétear, aforar, preparación de rectivos así como de medios de cultivo. Al igual que a errores inherentes al método.

No hay que olvidar que también existe una gran variabilidad al trabajar con microorganismos principalmente porque en el análisis realizado se llevó a cabo mediante el recuento en placa el cual se basa en la suposición de que cada bacteria inoculada en el medio de cultivo se multiplicará y dará origen a una colonia visible, sin embargo no siempre es justificable sobre todo cuando se trabaja con cantidades pequeñas como fue en este caso 100 - 300 ufc/ml, observandose mayor variación las primeras. De igual manera algunos microorganismos suelen aparecer en los medios de cultivo como acumulos que se disgregan al preparar diluciones y en consecuencia cada acumulo dará origen a una colonia, asimismo las bacterias individualmente pueden quedar atrapadas en el agar tan cercanas entre si que varias colonias se pueden unir y contarse como una sola.

**8.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS CARACTERÍSTICAS
MACROSCÓPICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS MICROORGANISMOS
EN ESTUDIO**

MEDIO DE CULTIVO	TINCIÓN	COLOR	DIÁMETRO	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	BORDE
Agar Soya Trypticaseína	Bacilo gram negativo	Crema	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Flo	Bacilo gram negativo	crema	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Verde Brillante	bacilo gram negativo	crema	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Eosina azul de metileno	Bacilo gram negativo	púrpura con brillo metálico	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Sal Manitol	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento

**TABLA 21. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS CARACTERÍSTICAS
MACROSCÓPICAS DE Escherichia coli.**

MEDIO DE CULTIVO	TINCIÓN	COLOR	DIAMETRO	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	BORDE
Agar Soya Trypticaseína	Bacilo gram negativo	crema	4 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Flo	Bacilo gram negativo	crema con superficie verdosa	3 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Verde Brillante	Bacilo gram negativo	rosa débil	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Eosina azul de metileno	Bacilo gram negativo	púrpura	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Sal Manitol	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento

TABLA 22. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS CARACTERÍSTICAS
MACROSCÓPICAS DE Pseudomona aeruginosa.

MEDIO DE CULTIVO	TINCIÓN	COLOR	DIÁMETRO	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	BORDE
Agar Soya Trypticaseina	Bacilos gram negativos	crema	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Flo	Bacilos gram negativos	Crema	2 mm	Circular	convexa	suave	liso
Agar Verde Brillante	Bacilos gram negativos	rosa débil	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Eosina Azul de Metileno	Bacilos gram negativos	púrpura	2 mm	circular	convexa	suave	liso
Agar Sal Mantol	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento

TABLA 23. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS CARACTERÍSTICAS
MACROSCÓPICAS DE Salmonella typhimurium.

Con base a los resultados obtenidos de las características macroscópicas, en el agar soya tripticaseína no se observó gran diferencia de un microorganismo a otro solamente varió un poco en el tamaño, por lo cual se confirma que éste medio no es selectivo, sino que es un medio rico en nutrientes y tiene un uso general en los laboratorios de microbiología, ya que permite la multiplicación abundante y satisfactoria de gérmenes exigentes. Por lo mencionado anteriormente este medio fue solamente empleado en éste trabajo para realizar la cuenta en placa.

El agar flo es selectivo para la identificación de *Pseudomonas* ya que debido a la fluoresceína liberada presenta una coloración amarilla verdosa, coloración no presentada para *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, por lo tanto este medio no puede ser usado como selectivo para estos dos microorganismos.

El agar verde brillante es un medio selectivo para la identificación de *Salmonellas* se puede observar que las características obtenidas experimentalmente no concuerdan con las reportadas en la tabla No. 9 y que son las mismas que las obtenidas para *Pseudomona aeruginosa*, pero sin embargo se puede asegurar que si se trata del microorganismo inoculado *Salmonella typhimurium*, ya que estos resultados no difieren de los obtenidos por una cepa estándar. Por lo cual se recomienda usar agar sulfito bismuto o agar salmonella sghella.

El agar cosina azul de metileno es un medio selectivo para la identificación de *E. coli* en el cual se pueden observar las colonias de color púrpura con brillo metálico, característico de este microorganismo, a diferencia de *Salmonella typhimurium* y *Pseudomona aeruginosa*.

El agar sal manitol es un medio selectivo para la identificación de *Staphylococcus aureus*. En este estudio no se trabajó con este microorganismo, sin embargo se consideró importante el usarlo para observar la influencia que se tenía de este medio con respecto a los demás microorganismos en el cual se pudo observar que no hubo crecimiento, esto es debido que este medio contiene una alta concentración de sales (7.5 % de NaCl) lo cual inhibió el desarrollo de estos.

PRUEBAS BIOQUIMICAS		MICROORGANISMOS		
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
	CITRATO DE KOSER	-	+	+
	CITRATO DE SIMONS	-	+	+
TSI	GAS (H ₂)	+	+	-
	H ₂ S	-	+	-
	FONDO PICO	ACIDO ACIDO	ACIDA ALCALINO	ALCALINO ALCALINO
	CALDO ROJO FENOL Y MANITOL	+	+	-
	SACAROSA	+	-	-
	GLUCOSA	+	+	-
	LACTOSA	+	-	-
SIM	INDOL	+	-	-
	H ₂ S	-	+	-
	MOVILIDAD	+	+	+
RMVP	RM	+	+	-
	VP	-	-	+
	MIO	+	+	-

TABLA 24. RESULTADOS EXPERIMENTALES DE PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO.

Como se puede observar en las pruebas bioquímicas realizadas se obtuvieron los mismos resultados que nos marcan en la literatura (tabla 6,8,10) a excepción de la prueba de glucosa en Pseudomona aeruginosa la cual dio negativa y la literatura menciona que debe ser positiva pero utilizando el medio de Hugh y Leifson, y en este caso el medio de cultivo utilizado fue un medio convencional para detectar producción de ácidos por parte de bacterias fermentadoras como las enterobacterias, sin embargo este no es adecuado para el estudio de los bacilos no fermentadores como es en este caso la Pseudomona aeruginosa, en el cual la mayoría de las especies se desarrollan muy lentamente y producen ácidos sumamente débiles. Hugh y Leifson fueron los primeros en idear un medio de oxidación-fermentación (O-F) que se adapta a las propiedades metabólicas de los bacilos no fermentadores. Este medio contiene 0.2 % de peptona, 1% de hidratos de carbono, de modo que la relación peptona-hidrato de carbono es 0.2:1 en contraste con la relación 2:1 halladas en medios de cultivo convencionales para la fermentación de hidratos de carbono. La menor cantidad de peptona reduce la formación de productos oxidativos apartir de peptona, que tiende a elevar el pH del medio y puede neutralizar los ácidos débiles producidos por los bacilos no fermentadores. La mayor concentración de hidratos de carbono acrecienta la producción bacteriana de ácido. La consistencia semisólida del agar, el uso de azul de bromotimol como indicador de pH, y la inclusión de una pequeña cantidad de buffer de difosfato, contribuyen a detectar la producción de ácidos.

Por medio de las pruebas bioquímicas, características macroscópicas, y microscópicas realizadas se puede concluir que no hubo ninguna contaminación mediante el manejo de las diferentes cepas y con esto se puede asegurar que los microorganismos recuperados fueron los mismos que los adicionados.

9.0 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar que el método de límites microbianos fue capaz de detectar, así como de cuantificar la cantidad de microorganismos presentes como son: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, y *Salmonella typhimurium* en la suspensión antiácida.

Por lo que se concluye que el método de límites microbianos fue lineal, exacto, y preciso, por lo tanto puede ser usado como método de rutina para el control microbiológico de la suspensión antiácida.

10.0 PROPUESTAS Y/ O RECOMENDACIONES

- 1.- Las muestras deben trabajarse bajo condiciones asepticas.
- 2.- Al adicionar la concentración de microorganismos a la muestra (suspensión antiácida), agitar e inmediatamente agregar los 10 ml a los caldos indicados.
- 3.- Utilizar un medio de cultivo más selectivo para la identificación de *Salmonella typhimurium* como agar *Salmonella-Shigella*, ó Sulfito Bismuto.
- 5.- El análisis microbiológico solo podrá ser realizado por personal capacitado para esta área.

11.0 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- CIPAM, Guías de "Validación De Métodos Analíticos, SSA."
- 2.- " FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS", 6a. ed, pp. 189-196, (1994).
- 3.-Remington, O."FARMACIA", 2a. ed, Interamericana, Buenos Aires, pp. 2021-2023. (1985).
- 4.-Diagnóstico Merck,"CONTROL MICROBIOLÓGICO DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y DE MATERIAS PRIMAS", 2a. parte México, pp.3-56, (1990).
- 5.-Alvarado, H. Castro. L. "CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NO ESTÉRILES". Curso organizado por el departamento de asistencia técnica, ENCB-IPN, México, pp. 47-62, (1984).
- 6.- Buenrostro, E, TESIS, LIC, QFB, "DETECCIÓN Y MINIMACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN FORMAS FARMACÉUTICAS NO ESTÉRILES", PP. 1-9, 37-42, (1974).
- 7.-Ramos. G., TESIS, Lic. QFB, "ELABORACIÓN DE UN MANUAL DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL CONTROL DE DIFERENTES FORMAS FARMACÉUTICAS", México, pp. 4-58, (1986).
- 8.- Helman, J., "FARMACOTÉCNIA TEORÍA Y PRÁCTICA TOMO V111", 1a ed, Continental, México, pp. 2406-2414, (1981).

- 9.-Braude, I., "MICROBIOLOGÍA CLÍNICA", 1a ed, Panamericana, Buenos Aires pp. 313-320, (1984).
- 10.-Burrows, W., "TRATADO DE MICROBIOLOGÍA", 2a ed, Interamericana, México, pp. 510-531, (1974).
- 11.- Davis, O, "TRATADO DE MICROBIOLOGÍA", 2a ed, Salvat, Barcelona, pp. 1478-1485, (1979).
- 12.-Frobisher, J., "MICROBIOLOGÍA Y PATOLOGÍA PARA ENFERMERAS", 5a. ed, Interamericana, México, pp. 62-66, (1976).
- 13.-Guerra, J., "VALIDATION ANALITICAL METHODS BY FDA, Pharm. Technol. 76, 3, 76-89, (1980).
- 14.-Koneman, E. "DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO", 3a. ed, Panamericana, México, pp. 36-60, 126-151, 152-237, (1989).
- 15.-Mac Faddin, "PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA", 1a. ed, Panamericana, México, pp. 27-37, 45-49, 61-70, 104-147, 190-197. (1987).
- 16.-Russel, A., "PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY", 3a ed, Blackwell Scientific Publications, Great Britain, pp. 315-351, (1983).
- 17.-Zimsser, W., "MICROBIOLOGÍA", 1a ed, Panamericana, Buenos Aires, pp. 697-699, 728-732, (1987).
- 18.-Lizer, M. "FARMACOLOGÍA", 6a ed, Atenco, Argentina, pp. 906-925, (1980).

- 19.-Katzung, B., "FARMACOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA", 2a ed, El Manual Moderno, México, pp. 788-790, (1986).
- 20.-Seeley W., "MICROBIOS EN ACCIÓN", 2a ed, Blume, España, pp. 52-55, 97-102, 223-240.(1973).
- 21.-Roger, S., "MICROBIOLOGÍA", 2a. ed, Aguilar, España, pp. 300-339, (1981).
- 22.- Carpenter, P, "MICROBIOLOGÍA", 2a. ed, Panamericana, México, pp. 62-66, (1976).
- 23.- CIPAM. "GUÍA PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS", Técnica No 4, México, pp.53-60. (1992).
- 24.-Goodman, I., "BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPÉUTICA", 5a ed, Interamericana, México, pp. 803-813, (1978).
- 25.-Manual Bioxon, "MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS DE DIAGNOSTICO", pp. 13, 19-49, 60-61.
- 26.-Manual de "MEDIOS DE CULTIVO", Comité Nacional de Validación. Dirección General de Control de Insumos para la Salud, (1990).
- 27.- Manual Merck, "MEDIOS DE CULTIVO", pp. 4-10, 239. (1990).
- 28.-Marquez, J., "PROBABILIDAD Y ESTADÍSTICA PARA CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, ENEP ZARAGOZA", pp. 89-93, 151-155, 192-, 211.-212, 355-407, 429-435, (1987).
- 29.-NORMA IMSS, "IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS", JCC 01/m.s.733.

- 30.-Mistalski,S., "MICROBIAL CONTAMINATION TROUBLES HOOTING",
Pharm. Engr. 7,1, 13-16, (1987).
- 31.-Kiyoshi, T. "AN EXPERT SYSTEM FOR ASSESSING THE MICROBIOLOGICAL
QUALITY OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS AN MATERIALS". Pharm. Techn.
12, 9, 154-158, (1988).
- 32.-Collings,V., "THE FRESHWATER ENVIROMENT AND ITS SIGNIFICANCE IN
INDUSTRY". J. App. Bact. 27, 143-150, (1964).
- 33.- Beans H, "PRESERVATIES FOR PHARMACEUTICALS". J. Soc. Of. Cosm.
Chem., 23, 703-720. (1972).
- 34.-Camacho, G, TESIS, LIC, EL ENSAYO MICROBIOLÓGICO
PARA AMOXICILINA EN SUSPENSIÓN POR DIFUSIÓN EN PLACA",
pp. 76-78, (1993).
- 35.-Fernandez, E., "MICROBIOLOGÍA SANITARIA DE AGUA Y ALIMENTOS", 1.
Uniersidad de guadalajara, México, pp. 20-31, 103-140, (1981).
- 36.-Sidney, M., "DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO", 7a ed, Panamericana,
Buenos aires, pp. 396-404, (1989)
- 37.-"THE UNITED STATES PHARMACOPEIA", NF. XX111, ROCKVILLE,
pp. 1681.1686, (1995).

APENDICE A (MEDIOS DE CULTIVO)

MEDIO DE CULTIVO: Cualquier sustancia que pueda ser usada para el cultivo de microorganismos, puede ser llamada un medio de cultivo.

OBJETIVO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- a) Fomentar el crecimiento microbiano en forma que pueda comprobarse las características del cultivo.
- b) Facilitar algunas reacciones bioquímicas, que pueden ser demostrables por observación directa o bien indirecta por subsecuente reacciones en presencia de algunos reactivos adicionales.

CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN BASE A SU CONSISTENCIA

MEDIO LÍQUIDO

El medio líquido se maneja fácilmente y con sencillas precauciones puede trasvasarse de un recipiente a otro sin peligro de contaminación. Además en todos los medios líquidos se puede desarrollar favorablemente los microorganismos proporcionándoles las condiciones ambientales, físicas, y químicas.

El crecimiento en un medio líquido puede manifestarse de diferentes formas:

- a) Enturbiamiento: Es una opacidad mas o menos densa.
- b) Formación de velo: Una pequeña masa de células que flotan en la parte superior del medio de cultivo.
- c) Sedimento: Se forma un depósito de células que permanecen en la parte inferior del cultivo, pero que se pone necesariamente en suspensión si el tubo se sacude suavemente.

MEDIO SÓLIDO

Los medios sólidos que en su origen fueron creados para el aislamiento de microorganismos en cultivos puros, se emplean ahora de un modo universal para casi todos los trabajos generales de cultivo.

La consistencia de un medio de cultivo líquido a sólido se puede lograr agregando agar, el cual es un polisacárido obtenido de algas marinas. Al 2% es hidrolizado por muy pocas bacterias, tiene un punto de fusión aproximadamente de 92°C y un punto de solidificación de 42°C. También se puede cambiar la consistencia del medio sólido agregando gelatina suero o albúmina de huevo.

En este medio se pueden observar las características macroscópicas de las colonias las cuales pueden ser:

- a) Colonia completa: Puede ser puntiforme, circular, rizoide, irregular, filamentosa.
- b) Borde: Puede ser entero, ondulado, lobulado, rizado.
- c) Elevación: Puede ser elevada, plana, convexa, pulvinada, umbilicada.
- d) Superficie: Puede ser lisa, brillante, erizada, rugosa, seca, pulverenta.
- e) Color
- f) Diámetro

MEDIO SEMISÓLIDO

Se emplean principalmente para llevar a cabo cultivos de cepas o para propagar a los anaerobios.

La consistencia de un medio líquido a semisólido se puede lograr por medio de la adición de agar, gelatina, o albúmina.

CLASIFICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS EN BASE A SUS NUTRIENTES

MEDIOS DE PREENRIQUECIMIENTO

Estos medios tienen como función resucitar, reactivar, o iniciar la proliferación de un determinado grupo de microorganismos. Este efecto permite una recuperación mas completa de aquellos gérmenes presentes en un producto que ha sido sometido a tratamientos que afecten la viabilidad celular. La formulación de estos medios es sencilla, como es el caso de agua peptonada, caldo lactosado.

MEDIOS SIMPLES O BÁSICOS

Estos son los medios mas simples que solo contienen algún extracto de carne u otra infusión simple, peptona, sal y agua. El extracto o la infusión de carne, proporciona al organismo los aminoácidos, sales, vitaminas y pequeñas cantidades de carbono, nitrógeno, hidrogeno y otros elementos.

Las sales, usualmente cloruro de sodio, sirven para obtener la isotonicidad requerida para el mantenimiento de presión osmótica constante. El agua sirve como disolvente y medio de transporte. Como la mayoría de las aguas contienen gran cantidad de diversos minerales, de los cuales el cobre es en particular perjudicial para las bacterias, es aconsejable usar agua destilada. como ejemplos de estos medios podemos encontrar Caldo nutritivo, Agar nutritivo, Caldo triptico de soja, Agar triptico de soya, Caldo y Agar de infusión de cerebro y corazón. Caldo y agar de infusión de corazón.

MEDIOS ENRIQUECIDOS

Son aquellos medios básicos que han sido complementados con líquidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas y otros nutrientes claramente definidos como tales. Como ejemplo de estos medios tenemos: Agar sangre, Agar con sangre y chocolate, Caldo de suero, Agar con triptosa, Agar de Bordet Gengou, Medio de Levinthal, Agar de Sabouraud con dextrosa, Agar de Mueller-Hinton. Etc.

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

Los medios de enriquecimiento favorecen el desarrollo de un grupo, género o especie particular de microorganismos, que permite con mayor éxito su posterior aislamiento. El caldo selenito, el caldo tetrionato, y el caldo de soya con cloruro de sodio son ejemplos de de estos medios.

MEDIOS DIFERENCIALES-SELECTIVOS

Son medios sólidos a los cuales se les han agregado ciertos reactivos, que impiden el crecimiento de la mayoría de las bacterias, permitiendo por lo tanto el aislamiento algunas cuantas seleccionandolas de las muestras que contengan grandes número de microorganismos indeseables. Y además contienen algún indicador, lo cual hace visible por la coloración en forma observable de los microorganismos.

MEDIOS ESPECIALES O MEDIOS DE ENSAYO

Son medios empleados para comprobar una o mas características bioquímicas; Estos medios se crearon con el fin de identificar y clasificar a los microorganismos según sus actividades metabólicas particulares. Ejemplo agar TSI (agar hierro triple azúcar), agar SIM (sulfuro, indol, movilidad), agar Citrato de Simmon, Caldo Rojo de Metilo Vogues Proskauer, etc. (20)

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Extracto de carne	3
Peptona	5
Cloruro de sodio.	5
Agar.	15

TABLA A-1. COMPOSICIÓN DEL AGAR NUTRITIVO

PREPARACIÓN

Suspender 23g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar unos 15 min. y calentar a ebullición de 1 a 2 min. hasta disolver el producto. Distribuir y esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 min.

pH final 6.8 ± 0.2

USOS

El agar nutritivo es un medio de uso general en el laboratorio, no es selectivo y es adecuado para el cultivo de microorganismos poco exigentes. Puede emplearse en bacteriología sanitaria, médica e industrial.

Es muy empleado en los análisis bacteriológicos de aguas potables, de uso industrial y residuales, leche y otros alimentos. Se le emplea también en la multiplicación de microorganismos para producir vacunas y antígenos en general etc.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de caseína	15.0
Peptona de soya	5.00
Cloruro de sodio	5.00
Agar	15.00

TABLA A-2. COMPOSICIÓN DEL AGAR SOYA TRUPTICASEÍNA

PREPARACIÓN

Suspender y remojar de 10-15 min. 40g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente durante un min. para que se disuelva. Esterilizar en un autoclave entre 118 y 121°C y a una presión no mayor a 15 lb por 15 min. Enfriar y vaciar en cajas de petri.

pH después de esterilizar 7.3 ± 0.2

USOS

Es un medio sólido muy rico en nutrientes por lo que tiene un uso general en los laboratorios de microbiología. Permite la multiplicación abundante y satisfactoria de gérmenes exigentes, como Neumococos, Estreptococo, Neisserias, etc.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de Caseína	5.000
Peptona de carne	5.000
Extracto de carne	1.000
D-manitol	10.00
Cloruro de sodio	75.00
Agar	15.00

TABLA A-3 COMPOSICIÓN DEL AGAR SAL Y MANITOL

PREPARACIÓN

Suspender 111 g del medio en un litro de agua destilada y remojar 15 min. Mezclar bien Calentar a ebullición durante un min. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb) de presión durante 15 min. vaciar en cajas petri.

USOS

Es un medio selectivo muy empleado para aislar estafilococos patógenos de materiales clínicos diversos (orina, genitales, heridas, exudados faríngeos, etc..) también se utiliza en la industria alimenticia con los mismos fines, el aislamiento e identificación de Estafilococos que se encuentran en la leche y productos lácteos, carnes y derivados, incluyendo conservas de pescado.

La degradación del manitol con producción de ácido cambia el color del medio, de rosado a amarillo. debido a su alto contenido de cloruro de sodio, puede hacerse una siembra masiva del material de estudio. Generalmente se incuba las placas unas 36 hrs. apareciendo las colonias de estafilococos no patógenos de tamaño pequeño y rodeadas de una zona roja; en cambio, las colonias de estafilococos patógenos fermentadores del manitol dan colonias mas grandes y rodeadas de una zona amarilla. Si agregamos a cada litro del medio, una yema de huevo en condiciones de esterilidad, los estafilococos, que además de fermentar el manitol producen lipasa, darán un precipitado amarillento de ácidos grasos alrededor de la colonia. Este fenómeno concuerda bastante bien con la propiedad de coagular el plasma que presentan los estafilococos patógenos coagulasa positivos.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Extracto de levadura	3.000
Mezcla de peptonas	10.00
Cloruro de sodio	5.000
Lactosa	10.00
Sacarosa	10.00
Rojo de fenol	0.080
Verde brillante	12.50
Agar	15.0

TABLA A-4 COMPOSICION DEL AGAR VERDE BRILLANTE

PREPARACIÓN

Suspender 58g del medio en un litro de agua destilada y dejar remojar 15 min. calentar agitando frecuentemente y hervir durante un min. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 min. y distribuir en cajas petri. pH después de esterilizar 6.9 ± 0.2

USOS

Debido a que es un medio fuertemente inhibitor, inocular las placas con una asada bien cargada con el material de estudio. Al mismo tiempo siembre otros medios selectivos menos inhibidores como el agar Deñoxicolato, SS, XLD, MacConkey, EMB, Agar tergitol 7. Cuando se sospecha que el material de estudio contiene bajas concentraciones de *Salmonella* es necesario inocular la muestra inicialmente en caldo tetrationato o caldo selenito-Cistina.

El medio, de un color café al principio pasa a rojo durante la incubación a 37°C. los microorganismos que degradan la lactosa son inhibidos completamente, presentando algunas de las cepas no inhibidas, colonias verde amarillentas, opacas y rodeadas de un halo amarillento. Los microorganismos lactosa negativos, como *Salmonella* y ocasionalmente *Proteus*, forman colonias de color rosa pálido transparente rodeadas de un halo rojo brillante

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de gelatina	10.00
Lactosa	10.00
Fosfato dipotásico	2.000
Agar	15.00
Eosina	0.400
Azul de metileno	0.065

TABLA A-5 COMPOSICIÓN DEL AGAR EOSINA AZUL DE METILENO

PREPARACIÓN

Suspender 37.4 g del medio en un litro de agua destilada, mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme. Remojar de unos 10-15 min. Calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un min. Esterilizar a no más de 121°C. (15 lb de presión) durante 15 min. El agar líquido estéril a 45°C se agita suavemente antes de vaciar a cajas petri.

pH después de esterilizar 7.1 ± 0.2

USOS

La fórmula de Levine ha sido empleada comúnmente para la investigación de coliformes.

CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS

Escherichia coli: De 2 a 3 mm. de diámetro, Azul negras en la parte central, y bordes claros a la luz transmitida. Presentando un brillo metálico verdoso a la luz reflejada.

Enterobacter aerogenes: Colonias de 4 a 6 mm de diámetro. Elevadas y mucoides. café grisáceas en el centro a la luz transmitida. Generalmente no tienen brillo metálico y con tendencia a unirse.

Salmonella y Shigella: Colonias transparentes, hasta incolora.

Candida albicans: Después de 24 hrs. a 35°C y aproximadamente a un 10% de dióxido de carbono se ve en forma de telaraña plumosa.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de cascina	10.00
Peptona de carne	10.00
Fosfato dibásico de potasio anhidro	1.500
Cloruro de magnesio heptahidratado	1.500
Glicerina	10.00
Agar	15.00

TABLA A-6 COMPOSICION DEL AGAR FLO (agar para *Pseudomona F*)

PREPARACIÓN

Suspender 37g de polvo en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol y mezclar bien. Remojar de 10 a 15 min. para que se hidraten correctamente las partículas de agar. Calentar agitando con frecuencia y hervir hasta disolución completa del medio aproximadamente un min. **NO SOBRECALENTAR.** Envasar en tubos de ensayo o en matraces y esterilizar en autoclave a 121°C entre 12 a 15 lb. durante 15 min. Distribuir en cajas petri.

USOS

Inocular las placas por estría superficial. El medio favorece la producción fluoresceína e inhibe parcialmente la formación de piocianina difundándose los pigmentos en el agar.

La piocianina da una fluorescencia verdosa o verde azulada en el agar TECH, mientras que la fluoresceína de un color fluorescente amarillo verdoso en el agar FLO. Obsérvese bajo luz ultravioleta.

En algunas ocasiones se encuentran cepas que elaboran ambos pigmentos en proporciones variables, por lo que varían los tonos de color de acuerdo a las cepas de *Pseudomonas*. Algunas cepas de *Pseudomonas* elaboran fluoresceína sola, otras únicamente piocianina y algunas otras los dos pigmentos.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Mezcla de peptonas	20.00
Cloruro de sodio	5.000
Lactosa	10.00
Sacarosa	10.00
Dextrosa	1.000
Sulfato de amonio férrico	0.200
Rojo de fenol	0.025
Agar	13.00
Tiosulfato de sodio	0.200

TABLA A-7 COMPOSICIÓN DEL AGAR HIERRO-TRIPLE -AZÚCAR

PREPARACIÓN

Suspender 59.4g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y disolución completa. distribuir en tubos de 13 X 100 mm. Esterilizar a 118°C (12 lb de presión) durante 15 min. Los tubos deben enfriarse en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.

pH después de esterilizar 7.3 ± 0.2

USOS

Su modo de acción es semejante al medio de Kligler que contiene dos azúcares, adicionando además con 1% de sacarosa. Esto permite el reconocimiento y exclusión de *Proteus*.

Hafnia y **Providencia** no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente y si en cambio fermentan la sacarosa con bastante rapidez, lo cual permite excluir a ese grupo de bacterias de **Salmonela** y **Shigella**.

Alc. = alcalino

Ac. = ácido

GÉRMENES	SUPERFICIE INCLINADA	FONDO	H ₂ S/ GAS
Arizona	alc.	alc.	+
Salmonella	alc.	alc.	+
Enterobacter aerogenes	alc.	alc.	-
Enterobacter cloacae	alc.	ac.	-
Klebsiella	alc.	alc.	-
Hafnia	alc.	alc.	-
Serratia	alc.	alc.	-
Citrobacter	alc.	ac.	+
Escherichia	alc.	ac. o neutro	-
Alkalescens- Dispar	alc.	ac. o neutro	-
Shigella	alc.	ac.	-
Proteus	alc.	ac.	-
Providencia	alc.	ac.	-

TABLA A-8. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS MICROORGANISMOS EN EL MEDIO TSI

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Fosfato dihidrogenado de amonio	1.000
Fosfato dipotásico	1.000
Cloruro de sodio	5.000
Citrato de sodio	2.000
Sulfato de magnesio	0.020
Agar	15.00
Azul de bromotimol	0.080

TABLA A-9. COMPOSICIÓN DEL AGAR CITRATO DE SIMMONS

PREPARACIÓN

Suspender 24.2 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar durante 5 a 10 min. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir volúmenes de 3 ml. en tubos de 13 X 10 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una profundidad de 1.0 a 1.5 cm. Se puede emplear como medio también en placas.

pH final 6.9 ± 0.2

USOS

Este medio se puede emplear de la misma manera que el Citrato de Koser para hacer la prueba de utilización de citrato como una de las reacciones del IMViC. Pueden hacerse cultivos en placa, o si se prefiere en el medio inclinado, se inocula estriando la superficie y puncionando el fondo. Los cultivos se incuban durante 4 días de 35 a 37°C. Si no se obtienen resultados precisos, lo cual puede suceder en cepas de Providencia, es necesario hacer nuevas pruebas incubando a temperatura ambiente durante 7 días. Solamente los microorganismos que utilizan el citrato como única fuente de carbono, crecen en el agar Citrato de Simmons. La aparición de un crecimiento visible generalmente va acompañado de un cambio alcalino (azul) del indicador.

Este medio puede ser utilizado especialmente en la diferenciación de bacilos entéricos como se indica a continuación:

NEGATIVOS: Escherichia, Shigella, Listeria.

POSITIVOS: Arizona, Citrobacter, Salmonella, Herella, Enterobacter, Klebsiella,

Serratia.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Extracto de levadura	3.000
Peptona de gelatina	10.00
Peptona de caseína	10.00
L.Ornitina	5.000
Dextrosa	1.000
Agar	2.000
púrpura de bromocresol	0.020

TABLA A-10. COMPOSICIÓN DEL MEDIO MIO

PREPARACIÓN

Disolver 31g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar unos 5 min. Calentar hasta ebullición. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. pH final 6.5 ± 0.2

USOS

Los cultivos son inoculados por punción en el medio MIO preparados en tubos y se incuban por 18-24 hrs. a 35°C. Se leen las reacciones de movilidad y de ornitidina descarboxilasa antes de agregar el reactivo de Kovacs para la prueba de indol. La movilidad es indicada por turbiedad del medio o por crecimiento extendido a partir de la línea de inoculación. La ornitidina descarboxilasa es indicada por el color púrpura del medio. La ornitidina negativa produce un color amarillo en el fondo que puede ser púrpura al final. Para la prueba de indol se añade de 3 a 4 gotas de reactivo de Kovacs, y se agita suavemente el tubo. La aparición del color rosa o rojo en el reactivo se interpreta como prueba positiva de indol. Comparar los resultados con el tubo testigo sin sembrarse.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de caseína	20.00
Peptona de carne	6.100
Sulfato de hierro y amonio	0.200
Tiosulfato de sodio	0.200

TABLA A-11. COMPOSICIÓN DEL MEDIO SIM

PREPARACIÓN

Suspender 30g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, agitando frecuentemente. Remojar durante 10 min. y hervir a ebullición durante un min. Distribuir en tubos de ensayo a una altura de unos 4 cm. y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 min

pH final 7.3 ± 0.2

USOS

Sembrar la cepa pura en estudio por picadura, alcanzando ésta unos tres cuartos de la longitud de la columna. Incubar a 35°C de 18 a 24 hrs. y leer los resultados. Ennegrecimiento indica la producción de sulfuros. Desarrollo solo a lo largo de la punción, inmovilidad. La movilidad del gérmenes revela por turbidez difusa en el seno del medio, y producción de indol por medio de los reactivos de Ehrlich o de Kovacs, que dan una coloración rojo púrpura si es positiva. También puede usarse para el mismo propósito, la tira de papel filtro impregnada con una solución de ácido oxálico. Esta se coloca cerca, en la boca del tubo, virando a un color rosado en el caso de formación de indol.

MICROORGANISMO	PRODUCCIÓN DE H ₂ S	PRODUCCIÓN DE INDOL	MOVILIDAD
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-
<i>Shigella</i>	-	+ ó -	-
<i>E. coli</i>	-	+	+ ó -
<i>Klebsiella</i>	-	+ ó -	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+ ó -	-	+
<i>Salmonella</i>	+ ó -	-	+ ó -

TABLA A-12. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS MICROORGANISMOS EN EL MEDIO SIM

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de caseína	20.00
Lecitina de soja	5.000

TABLA 13. COMPOSICIÓN DE CALDO PEPTONA DE CASEÍNA -LECTINA-TWEEN

PREPARACIÓN

Suspender 25g del medio en 960 ml. de agua destilada. Calentar a 60°C hasta completa disolución, agregar 40 ml de Tween-20. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave durante 15 min. a 121°C y 15 lbs. de presión.

La peptona es un digerido pancreático de caseína, adecuado para el cultivo de muchos grupos de bacterias incluyendo ciertos microorganismos de difícil crecimiento. El tratamiento enzimático produce poco daño a las vitaminas de la caseína y a los aminoácidos como el triptófano, lo que la hace adecuada para el cultivo de microorganismos exigentes.

El contenido relativamente alto en peptona de caseína, ofrece las mejores condiciones de regeneración para los microorganismos dañados, así como óptimas posibilidades de germinación de esporas. La lecitina y el polisorbato 20 son capaces de inactivar numerosas sustancias antimicrobianas. Así la soja-lecitina, según KOHN y col.(1963), CHIORI y col.(1965) y HUGO y FRIER (1969), inactiva a la Cetríimide, Clorhexidina, Fenoles clorados, acetato y Polimixina B. El polisorbato 20, según EVANS (1964) y TOWN (1966), inactiva a fenoles, derivados fenólicos, ácido p-hidroxibenzoico y sus ésteres. La combinación de ambos puede inactivar a compuestos de amonio cuaternario y a combinaciones de fosfonio. pH después de esterilizar 7.1 ± 0.1

USOS

Es un medio de precrecimiento que tiene como función reactivar la proliferación de microorganismos.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Heptadecil sulfato de sodio	0.100
Mezcla de peptonas	5.000
Extracto de levadura	3.000
Lactosa	10.00
Azul de bromotimol	0.025

TABLA A-14. COMPOSICIÓN DE CALDO TERGITOL 7

PREPARACIÓN

Suspender 18g del medio deshidratado en 920 ml de agua, disolver, adicionar 40 ml de Tween 20, y 40 ml de Lecitina de Soya (12.5%). Agitar hasta obtener una suspensión homogénea. Esterilizar en autoclave durante 15 min, a 121°C y 15 lbs. de presión.

Se utiliza este medio para el aislamiento de enterobacterias.

pH final 6.9 ± 0.2

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de caseína	17.00
Peptona de soya	3.000
Cloruro de sodio	5.000
Fosfato dipotásico	2.000
Dextrosa	2.500

TABLA A-15. COMPOSICIÓN DEL CALDO SOYA TRIPTICASEÍNA

PREPARACIÓN

Suspender 30g del medio deshidratado en 920 ml de agua destilada. Agitar, agregar 40 ml de Lecitina de soya (12.5%), y 40 ml de Tween 20. Agitar hasta obtener una suspensión homogénea. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C y a 15 lbs de presión.

USOS

El caldo de soya tripticaseína se ha empleado comunmente para muchos procedimientos de diagnóstico e investigación. Por ejemplo se usa para el aislamiento y pruebas de sensibilidad de especies patógenas delicadas y no delicadas, en la preparación de inóculos, producción de antígenos para pruebas de aglutinación y pruebas serológicas.

pH final 7.3 ± 0.2

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Mezcla de peptonas	5.000
Lactosa	4.000
Fosfato de sodio	10.00
Selenito ácido de sodio	4.000
L-cistina	0.010

TABLA 16 COMPOSICIÓN DEL CALDO SELENITO Y CISTINA

PREPARACIÓN

Suspender 23g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar ligeramente hasta que el medio se disuelva. Envasar en tubos de ensayo, preferiblemente con tapa de rosca, volúmenes entre 10-15 ml por tubo. Esterilizar a vapor fluente durante 15 min. El color del medio es beige o ligeramente rosa. No sobrecalentar ni autoclavar. El medio así preparado y herméticamente tapado, puede conservarse en buenas condiciones, hasta 3 meses en refrigeración. Si se emplea tubos con tapón de algodón, el medio dura poco menos de 2 semanas.

pH final 7.0 ± 0.2

USOS

El caldo Selenito y Cistina inhibe la multiplicación de las bacterias de crecimiento más rápido, como las coliformes, permitiendo así que las Salmonellas se reproduzcan con mayor facilidad. Sin embargo después de 18 hrs. de incubación, los microorganismos comenzales aumentan rápidamente su tasa de reproducción y comienzan a impedir el aislamiento de Salmonellas, por lo que es necesario practicar resiembras o subcultivos antes de que transcurra este tiempo crítico. Los pases a los medios diferenciales puede realizarse a partir de las 10 primeras horas de incubación.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Fosfato monopotásico	1.000
Fosfato de sodio y amonio	1.500
Sulfato de magnesio	0.200
Citrato de sodio	3.000

TABLA A-17. COMPOSICIÓN DEL CALDO CITRATO DE KOSER

PREPARACIÓN

Suspender 5.7g del polvo en un litro de agua destilada. Disolver y mezclar. Envasar en tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C y a 15 lbs de presión durante 15 min con los tapones algo flojos. Al final de esterilizar cerrar perfectamente las tapas.
pH final 6.7 ± 0.2

USOS

Se emplea para diferenciar a *E.coli* de *Enterobacter*, lo mismo que el agar Citrato de Simmons, pero su mayor utilidad está en que el Citrato de Koser es posible diferenciar entre coliformes de origen fecal (En su mayoría citratos negativos) de los provenientes del suelo, que en un 90% pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona especial No 1	7.000
Dextrosa	5.000
Fosfato dipotásico	5.000

TABLA A-18 CALDO ROJO DE METILO VOGUES PROSKAUER

PREPARACIÓN

Disolver 17g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, mezclar bien. Si es necesario, calentar un poco hasta disolución total. Distribuir y esterilizar entre 118 y 121°C. (no mas de 15 lbs. de presión) durante 15 min.

pH final 6,9 ± 0.2

USOS

En 1915 Clark y Lubs emplearon el rojo de metilo como indicador de acidez en los cultivos del grupo E.coli-Enterobacter. Esta prueba se conoce ahora como prueba del rojo de metilo y sirve para distinguir entre aquellos microorganismos que producen y mantienen una concentración alta de ácidos, de aquellos que producen inicialmente una menor cantidad y que además son capaces de atacar esos mismos ácidos, volviendo al medio neutro o alcalino, como Enterobacter.

Vogues y Proskauer describieron en 1898 una coloración rojo fluorescente que aparecía en ciertos cultivos, al agregarles unas gotas de solución de KOH. Más tarde se supo que esto era debido a la oxidación del acetyl-metil-carbinol que pasaba a diacetilo, el cual a su vez, reaccionaba con la peptona del medio dando un color rojo. Enterobacter oxida el acetyl-metil-carbinol y por lo tanto da la coloración roja, en cambio la E.coli no lo hace.

TÉCNICA

Reacción del rojo de metilo:

A 5 ml. de un cultivo de 5 días, se le agregan 5 gotas de solución de indicador. En una reacción positiva se debe tener un color rojo bien definido, en tanto que el color amarillo constituye una prueba negativa.

Preparación del indicador: Pesar 0.1g de rojo de metilo disolver en 300 ml de alcohol al 95% y diluir a 500 ml con agua destilada.

Reacción de Vogues-Proskauer:

Se Preparan 960 ml de una solución de KOH al 10% y se le agrega una solución de 1 g de Sulfato de cobre pentahidratado en 40 ml de una solución concentrada de hidróxido de amonio. A 5 ml de este álcali, que contiene sulfato cúprico y amonio de un color rojo de osina indica la presencia de acetyl-metil-carbinol.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de caseína	10.00
Cloruro de sodio	5.000
Rojo de fenol	0.018
Manitol	5.000

TABLA A-19. COMPOSICIÓN DEL CALDO ROJO FENOL Y MANITOL

disolver 20g del polvo en un litro de agua destilada. En caso de que el medio sea destinado al cultivo de organismos anaerobios se le puede agregar de 0.5 a 1.0g de agar. Para la investigación de formación de gas, los tubos Durham pueden ser empleados. Colocar los tubos en un recipiente y esterilizar a 116-118°C y no más de 12 lbs de presión durante 15 min.

USOS: Medio empleado para determinar reacciones de fermentación.

pH final 7.4±0.2

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Peptona de caseína	10.00
Cloruro de sodio	5.000
Rojo de fenol	0.018

TABLA A-20. COMPOSICIÓN DEL CALDO BASE ROJO DE FENOL

PREPARACIÓN

Disolver 15g del polvo en un litro de agua destilada, agregar de 5 a 10g de carbohidratos si desea. Si el medio líquido va a ser destinado al cultivo de anaerobios se le puede agregar de 0.5 a 1.0g de agar. para la formación de gas se pueden emplear tubo Durham. Colocar los tubos en un recipiente adecuado y esterilizar a 116-118°C y no más de 12 lbs. de presión durante 15 min.

pH final 7.4±0.2

USOS

Sirve como caldo base para realizar las pruebas de fermentación de lactosa, sacarosa, y dextrosa.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Lactosa	5.00
Base de caldo rojo de fenol	15.0

TABLA A-21. COMPOSICIÓN DEL CALDO ROJO FENOL Y LACTOSA

pH final 7.4±0.2

USO: Medio empleado para determinar las reacciones de fermentación de la lactosa.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Dextrosa	5.00
Base de caldo rojo de fenol	15.00

TABLA A-22. COMPOSICIÓN DEL CALDO ROJO FENOL Y DEXTROSA

pH final del medio 7.4±0.2

USO: Medio empleado para determinar las reacciones de fermentación de la dextrosa.

COMPONENTE	CANTIDAD (g)
Sacarosa	5.00
Base de caldo rojo de fenol	15.00

TABLA A-23. COMPOSICIÓN DEL CALDO ROJO FENOL Y SACAROSA

USOS

Medio empleado para determinar las reacciones de fermentación de la sacarosa. La forma de esterilización del caldo rojo fenol, sacarosa, dextrosa y lactosa se procede a realizar de la misma forma que la base de caldo rojo fenol.

pH final del medio 7.4 ± 0.2

APENDICE 2

FÓRMULAS UTILIZADAS EN LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

1) MEDIA: $\bar{X} = \Sigma x / n$

2) % DE RECOBRO = unidades formadoras de colonias recuperadas/ unidades formadoras de colonias adicionadas X 100

3) PENDIENTE: $b = \frac{nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$

4) ORDENADA AL ORIGEN: $a = \frac{(\Sigma y) - (b)(\Sigma x)}{nt}$

5) COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

$$r = \frac{\sqrt{nt[(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2 / [nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}}$$

6) COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN: $r^2 = (r)^2$

7) INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

$$I.C = (b) - (t_{1-\alpha/2, n-2})(S_{y/x} / (\sqrt{n-1})(S_x)) < B < (b) + (t_{1-\alpha/2, n-2})(S_{y/x} / (\sqrt{n-1})(S_x))$$

8) ERROR ESTANDAR DE REGRESIÓN

$$S_{y/x} = (\sqrt{(n-1)/(n-2)})(S^2y - b^2S^2x)$$

9) ESTADIGRAFO DE CONTRASTE PARA LA PENDIENTE

$$t = (b - b_0) / (S_{y/x}) / (\sqrt{n-1}) (S_x)$$

10) INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % PARA LA ORDENADA AL

$$\text{ORIGEN: I.C.} = (a) - (t_{1-\alpha/2, n-2}) (S_{y/x}) (\sqrt{(1/n + \bar{X}^2 / n-1) (S^2_x)})$$

$$< A < a + (t_{1-\alpha/2, n-2}) (S_{y/x}) (\sqrt{(1/n + \bar{X}^2 / n-1) (S^2_x)})$$

11) ESTADIGRAFO DE CONTRASTE PARA LA ORDENADA AL ORIGEN

$$t_{cal.} = (a - a_0) / (S_{y/x}) (\sqrt{(1/n + \bar{X}^2 / n-1) (S^2_x)})$$

12) DESVIACION ESTANDAR: DE = $\sqrt{n(\sum x^2) - (\sum x)^2 / n(n-1)}$ **13) COEFICIENTE DE VARIACION: C.V = (DE / \bar{X}) (100)****14) VARIANZA MUESTRAL: $S^2 = (\sum X^2_i) - (n \sum x^2) / n-1$** **15) ESTADIGRAFO DE CONTRASTE PARA LA EXACTITUD**

$$t = (\bar{X} - 100) / (S / \sqrt{n})$$

16) INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % PARA LA EXACTITUD

$$I.C. = (\bar{X}) \pm (t_{1-\alpha/2}) (S / \sqrt{n})$$

17) ESTADIGRAFO DE CONTRASTE PARA LA REPETIBILIDAD

$$X_i^2 = (n-1) (S^2) / (\sigma^2)$$

18) INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA REPETIBILIDAD

$$I.C. = (n-1) / (X_{i^2, 1-\alpha/2}) S^2 < \sigma^2 < (n-1) / (X_{i^2, \alpha/2}) S^2$$

19) ANALISIS DE VARIANZA (TABLA DE ANADEVA)

	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRA-DOS	MEDIA DE CUADRA-DOS	F _{cal}	F _{0.05}
ANALISTA (a)	$gla = a - 1$	SC _a	$MCa = \frac{SCa}{gla}$	$Fa = \frac{MCa}{MCd}$	$F_{gla / gld}$
DIA (d)	$gld = (d - 1) a$	SC _d	$MCd = \frac{SCd}{gld}$	$Fd = \frac{MCd}{MCE}$	$F_{gld / gle}$
ANALISTA-DIA -	$(a - 1)(b - 1)$	SC _{ad}	$MC = \frac{SCad}{glad}$	$Fad = \frac{MCad}{MCE}$	$F_{glad / gle}$
ERROR (e)	$gle = (r - 1) ad$	SC _e	$MCE = \frac{SCE}{gle}$		

EL modelo representado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_j(i) + E_K(ij)$$

DONDE

Y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la k ésima muestra analizada por el iésimo analista en el j ésimo día.

μ = Media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra

α_i = Efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1, \dots, a$)

$\delta_j(i)$ = Efecto del día anidado en el analista. (donde $j = 1, \dots, d$)

$E_K(ij)$ = Error del método analítico (donde $k = 1, \dots, r$)

a = número de analistas (donde $a = 2$)

d = número de días (donde $d = 2$)

r = número de replicas (donde $r = 3$)

CALCULOS PRELIMINARES

1. Calcular la suma de las combinaciones analista-día (Y_{ij})

$$Y_{11..} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12..} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{21..} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22..} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

2. Calcular la suma para cada analista ($Y_{i..}$)

$$Y_{1..} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{2..} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

3. Calcular la suma total ($Y_{...}$)

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

4. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día

$$\sum \sum Y^2_{ij} = (Y_{11..})^2 + (Y_{12..})^2 + (Y_{21..})^2 + (Y_{22..})^2$$

5. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en los dos días

$$(\sum Y_{i..})^2 = (Y_{1..})^2 + (Y_{2..})^2$$

6. Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado

$$\sum \sum \sum Y^2_{ijk} = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

7. Calcular la suma del cuadrado del analista (SCa), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SCa = \sum Y^2_{i.} / dr - Y^2_{..} / adr$$

8. Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), con la siguiente fórmula:

$$SCd = \sum \sum Y^2_{ij} / r - \sum Y^2_{i..} / dr$$

9. Calcular la suma de cuadrados del error

$$SCe = \sum \sum \sum Y^2_{ijk} - \sum \sum Y^2_{ij} / r$$

10. SC subtotal = $\sum \sum Y^2_{ij} / n_{ij} - Y^2_{..} / n$

11. Scad = Scsubtotal - (Sca + SCd)