



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE
PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y
VALIDACIÓN DE MÉTODOS
ANALÍTICOS EN SCHERING
PLOUGH MÉXICO, S.A. DE C.V.**

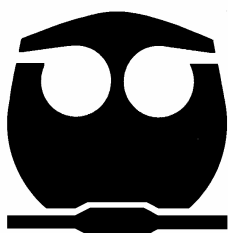
INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ALEJANDRO RODRÍGUEZ TREJO



MÉXICO, D.F.

2006



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	Prof. Aída Navas Pérez
Vocal	Prof. Lino Joel Reyes Trejo
Secretario	Prof. Ruth Edith Martin Fuentes
1er. Suplente	Prof. Norma Angélica Castellanos Chávez
2º. Suplente	Prof. Raúl Lugo Villegas

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Control Biológico, Schering Plough S.A. de C.V.

Nombre completo y firma del asesor del tema

M. en C. Lino Joel Reyes Trejo

Nombre completo y firma del supervisor técnico

Q.F.B. María del Socorro Medina Martínez

Nombre completo y firma del sustentante

Alejandro Rodríguez Trejo

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las facilidades para la culminación de mis estudios.

A los laboratorios Schering-Plough S.A. de C.V. por el apoyo recibido para la realización de este trabajo; y muy en especial a la Q.F.B. María del Socorro Medina Martínez por toda la ayuda y el gran apoyo que me ha brindado en todo momento.

Agradezco profundamente a la Q.B.P. Beatriz Espino Meléndez por el apoyo que me ha brindado y por sus valiosos consejos.

Al H. Jurado por su asesoría y supervisión académica en la realización de este informe y muy en particular al Prof. Lino Joel Reyes Trejo por su confianza y apoyo durante estos años.

A todos mis familiares y amigos que desde el principio creyeron en mí.

A Todos

Muchas Gracias

Con cariño a mis Padres
y a mi Hermana

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	3
4. MONITOREOS AMBIENTALES DE AREAS PRODUCTIVAS... ..	5
4.1 AREAS ESTERILES	
4.2 AREAS NO ESTERILES	
5. MONITOREO DE SISTEMA DE AGUA.....	9
5.1 TECNICA DE FILTRACION POR MEMBRANA	
5.2 ANÁLISIS SANITARIO DEL AGUA	
5.3 ESTIMACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)	
5.4 CUENTA ESTANDAR EN PLACA	
5.5 PRUEBAS PARA LA DETERMINACION DE PRESENCIA DE BACTERIAS COLIFORMES	
6. PRUEBA DE LIMITES MICROBIANOS.....	13
6.1 METODO DE FILTRACION POR MEMBRANA.....	13
6.1.1 CUENTA DE MESOFILICOS AEROBIOS, HONGOS Y LEVADURAS	
6.1.2 INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS OBJETABLES	
6.2 METODO DE VACIADO EN PLACA.....	14
6.2.1 CUENTA DE MESOFILICOS AEROBIOS, HONGOS Y LEVADURAS	
6.2.2 INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS OBJETABLES	
7. DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE 2 x 2 PUNTOS	16
7.1 PREPARACION DEL ESTANDAR DE REFERENCIA	
7.2 PREPARACION DE LA SUSPENSION MICROBIANA	
7.3 METODOLOGIA	

8. PRUEBA DE ESTERILIDAD.....	18
8.1 METODO FILTRABLE	
8.2 METODO DIRECTO	
9. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS MICROBIOLOGICOS.....	20
9.1 METODOLOGIA	
9.1.1 CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO	
9.1.2 VALIDACION DE BACTERIOSTASIS Y FUNGISTASIS	
9.1.3 VALIDACION DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD	
10. CONCLUSIONES.....	25
11. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	26
12. APENDICE.....	28

1. INTRODUCCION

Los medicamentos han sido y son compuestos esenciales para prevenir, aliviar y conservar la salud del ser humano y de las comunidades, para prevenir, curar o aliviar enfermedades. Los medicamentos han sido considerados como un "bien social". Sin embargo, el uso de medicamentos no está exento de riesgos.

Por tal motivo, es necesario que los medicamentos sean sometidos a un estricto control de calidad integral, el cual será evaluado minuciosa y responsablemente.



FIG. 1. MATERIAL PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS. TOMADO DE [1]

Las acciones de control de calidad no están referidas únicamente al análisis fisicoquímico o microbiológico de los medicamentos sino a un sistema integral de calidad que involucra distintas áreas de la misma. Por tanto, un medicamento debe diseñarse, construirse, controlarse y conservarse.

Los departamentos de aseguramiento o de control de calidad de los laboratorios farmacéuticos serios, ponen toda su atención en cada uno de los aspectos que intervienen en el procesamiento y control analítico final que incluye en varios casos, los servicios de inspección postventa, cabe

destacar que el sistema de control de calidad en los laboratorios farmacéuticos prevé que exista un criterio de independencia y autonomía en las decisiones que involucran la aprobación o rechazo de los lotes fabricados. Los farmacéuticos que prestan o han prestado sus servicios profesionales en esos laboratorios, saben muy bien que sus exigencias superan a las exigencias oficiales.

Los conceptos sobre Calidad y su control han ido variando con el tiempo, esto se debe al incremento de la producción industrial, al comercio internacional y esto tiene como objetivo principal alcanzar la excelencia para lo cual se han ido sistematizando los conceptos y se han creado (o modificado) herramientas y normas para lograr y mantener la Calidad. Estos avances llegan a coexistir con una serie de normas o herramientas específicas para lograr la producción de medicamentos de calidad. Uno de estos es el de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) ("Good Manufacturing Practices", "GMPs").

Cuando recién se presentaron las Buenas Prácticas de Manufactura, a nivel de la FDA de los EEUU, fueron llamadas "Normas Paraguas" ("abrir el paraguas antes que empiece a llover"), en 1967, la Asamblea Mundial de la Salud aprobó una primera versión, la cual fue actualizada con un nuevo documento en 1975, posteriormente se han actualizado estas normas y se han preparado guías muy adecuadas por la OMS y por OPS.

En síntesis, Buenas Prácticas de Manufactura indican lo que debe hacerse, y las medidas a tomar, durante la elaboración de productos farmacéuticos para lograr su conformidad a las especificaciones que garanticen su calidad, eficacia e inocuidad, pero "no necesariamente a cómo realizar las operaciones de fabricación y de control de calidad".

LABORATORIOS DE CONTROL DE CALIDAD

En la industria farmacéutica, los laboratorios de control de calidad no son meros auxiliares, como a menudo y equivocadamente se han considerado. Los laboratorios constituyen, junto con las BPM y los procesos de validación, las



FIG. 2. PROCESO DE INCUBACION DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS. TOMADO DE [1]

"piedras angulares" del sistema de aseguramiento de la calidad. Las pruebas analíticas fisicoquímicas que los laboratorios emplean para demostrar la pureza, potencia, identidad, desempeño, estabilidad y otras características, son muy valiosas. Las técnicas microbiológicas para demostrar la presencia de contaminaciones con gérmenes de alteración patógenos y no patógenos en productos estériles y no estériles, deben reunir, al igual que las fisicoquímicas, una serie de características microbiológicas para que sean confiables, tanto para los medicamentos como para los alimentos y otros productos. Entre las varias características se encuentran la

Especificidad, Sensibilidad, Reproducibilidad, Rapidez, Bajo Costo, Exactitud, Precisión y Robustez; últimamente también se está exigiendo la Trazabilidad y, para algunas técnicas, la determinación de la Incertidumbre en los análisis.

Un aspecto a considerar en las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), es que igualmente exista una buena administración de los laboratorios.

Es también interesante señalar que dichos laboratorios deben tener la capacidad de realizar controles simplificados de calidad, para la detección de defectos galénicos, cambios de color, olor, precipitación, turbidez, partículas, etc.

2. OBJETIVO

El presente informe tiene como objetivo demostrar que el sustentante posee amplio conocimiento en las técnicas analíticas microbiológicas que se realizan en el departamento de control microbiológico de los laboratorios farmacéuticos.

3. INFORMACION GENERAL SOBRE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

La información que se presenta a continuación, tiene el propósito de demostrar las actividades que el sustentante realiza desde Agosto del 2002 a la fecha. Los conocimientos, destrezas y habilidades adquiridas en el manejo de técnicas analíticas microbiológicas, monitoreos ambientales y validación de métodos analíticos. Los cuales se fueron adquiriendo según el programa de capacitación que la compañía tiene para con su personal, comenzando así con:

- a) Monitoreos ambientales en áreas estériles y no estériles de fabricación y acondicionamiento de los productos que se comercializan, abarcando un periodo de aproximadamente 7 meses.
- b) Monitoreo del sistema de agua de tratamiento, purificada, grado inyectable y vapor limpio. Realizando esta actividad aproximadamente 5 meses, incluyendo la capacitación teórico-práctica de 2 analistas.
- c) Prueba de Límites Microbianos en materia prima, material de empaque, producto en proceso, terminado y de estabilidades. Ejecutando los análisis durante 5 meses y actualmente se realiza la validación de la metodología de acuerdo a la codificación de los productos.
- d) Determinación de Potencia de Antibióticos por medio del método de 2 x 2 puntos en materia prima, producto en proceso, terminado y de estabilidad Realizando a la fecha análisis de rutina y colaborando con la validación del método de acuerdo a los códigos de los productos.
- e) Prueba de esterilidad en aisladores biológicos y en áreas estériles, realizando a la fecha análisis de rutina y la validación de productos estériles de acuerdo a su codificación.
- f) Validación de Métodos Analíticos, la cual consiste en la búsqueda y recopilación de información compendial, siguiendo políticas internas e internacionales de la compañía, para el establecimiento de especificaciones que se plasmarán en los protocolos diseñados para realizar la validación de la metodología.

Una vez concluida y aprobada por casa matriz, la información obtenida de los experimentos realizados se modificarán los procedimientos normalizados de operación; los cuales deben de incluir las nuevas especificaciones.

- g) Cabe mencionar que de acuerdo a las políticas de confidencialidad de la empresa, no es posible describir totalmente las actividades realizadas.

4. MONITOREOS AMBIENTALES EN AREAS PRODUCTIVAS

La finalidad de los monitoreos ambientales de áreas estériles y no estériles desde el punto de vista microbiológico es proveer información sobre la calidad ambiental y cantidad de partículas viables que presenta la planta en superficies, aire y personal (que ingresa a las áreas estériles), generando simultáneamente datos de tendencia e identificación de microorganismos que puedan estar presentes en las evaluaciones, con los cuales en determinado momento se puedan tomar acciones correctivas y preventivas cuando se generen resultados fuera de especificación.



FIG. 3. AREAS PRODUCTIVAS ESTERILES. TOMADO DE [2]

Los monitoreos ambientales evidencian la presencia o ausencia de contaminación microbiológica con la cual los productos fueron elaborados y acondicionados para su comercialización y puedan ser administrados con confianza al paciente.

Para llevar a cabo su ejecución deben seguirse estrictamente los procedimientos normalizados de operación, los cuales nos indican:

- a) Material empleado
- b) Medios de cultivo enriquecidos, selectivos y diferenciales
- c) Identificación de las muestras según los puntos de muestreo
- d) Puntos de muestreo
- e) Frecuencias de muestreo
- f) Tiempos de exposición
- g) Tiempos y temperaturas de incubación de las muestras.
- h) Documentos para realizar los registros generados
- i) Determinación de las cuentas microbianas
- j) Proceso de identificación de género y especie de los microorganismos aislados.
- k) Reportes e interpretación de resultados
- l) Generación de resultados adversos.
- m) Graficas de tendencias ambientales.

Los puntos de muestreo son designados dependiendo de la calidad del aire y de las superficies que se pretende evaluar, por lo que existen áreas con optima calidad como lo son las áreas estériles, que cuentan con filtros especiales destinados a retener el 99.95 % de la biocarga existente en el ambiente y un programa de sanitización constante. No así, en áreas donde no es necesario el uso de estos sistemas, ya que se fabrican medicamentos que en su formulación no necesitan de un estricto control ambiental. A estas áreas se les denomina áreas de fabricación no estériles y debido a esto los monitoreos se clasifican en dos clases: Monitoreo de áreas estériles y Monitoreo de áreas no estériles.

4.1 MONITOREO DE AREAS ESTERILES

Esta evaluación incluye:



FIG. 4. VESTIMENTA REQUERIDA PARA INGRESO A AREAS ESTERILES. TOMADO DE [3]

a) Personal

El personal debe ser evaluado por placas de contacto en diversos puntos críticos del uniforme con una frecuencia que demuestre que el individuo que ingrese a estas áreas esté capacitado y no presente una fuente potencial de contaminación directa que comprometa los procesos.



FIG. 5. PLACAS DE CONTACTO Y EXPOSICION CON MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO. TOMADO DE [14]

b) Exposición de placas

Esta exposición se realiza por exposición de placas por un periodo de tiempo determinado y contienen medio de enriquecimiento. El monitoreo se realiza cotidianamente en ausencia o presencia de personal y de actividad para corroborar la calidad ambiental que existe dentro de las instalaciones.

c) Superficies

Las superficies tanto expuestas como ocultas forman parte de la evaluación completa del ambiente y deben ser evaluadas por placas de contacto en diversos puntos críticos y aseguran la integridad aséptica del área.



FIG. 6. AUTOMUESTREADOR DE AIRE CON MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO. TOMADO DE [12]

d) Nitrógeno y aire comprimido

Los gases como el nitrógeno y el aire comprimido que son utilizados en los procesos de presurización o modificación de atmósferas de productos farmacéuticos, mantenidos en tanques de almacenamiento y redes de distribución, deben ser evaluados con una frecuencia tal que garantice que el gas o el aire utilizado no comprometa la calidad microbiológica del producto. Esta evaluación se realiza con automuestreadores y medio de enriquecimiento que capturan la biocarga que pudiera existir en un volumen determinado.

4.2 MONITOREO DE AREAS NO ESTERILES

El cual incluye la evaluación de:

a) Exposición de placas

Al igual que en las áreas estériles, es necesario evaluar por exposición de placas la calidad ambiental de áreas con carga microbiana habitual dependiendo de la actividad (limpieza, sanitización, fabricación y/o llenado del producto) ayuda a tomar acciones correctivas, y preventivas cuando se presenten microorganismos objetables en el ambiente.

b) Superficies

Las superficies expuestas son evaluadas al igual que en las áreas estériles por placa de contacto en diversos puntos críticos y aseguran la integridad aséptica del área y mantienen un control de la biota microbiana en las superficies de esta área.

Una vez definidos los puntos de evaluación por validación del área, se procede a la preparación de los materiales. Estos deben ser medios de cultivo que cumplan pruebas de promoción de crecimiento y esterilidad, lo cual garantiza la generación de resultados confiables y no una contaminación cruzada en las áreas de muestreo.

El ingreso a área no estériles, se realiza siguiendo procedimientos normalizados de acceso. En estos sitios se requiere el uso de una vestimenta que cumpla con los lineamientos de seguridad (casco, goggles, faja, etc.) y uniformes destinados al uso exclusivo del personal.



FIG. 7. ALMACEN DE PRODUCTO TERMINADO (AREAS NO ESTERILES). TOMADO DE [6]

Una vez establecida la frecuencia y el tiempo de exposición se procede a colocar el material de muestreo en los puntos establecidos previamente. Al término de la exposición se retiran las muestras y se someten a las temperaturas y tiempos indicados de incubación para determinación de cuenta de bacterias y hongos.

Finalizando estos periodos, se determina la cuenta total de microorganismos presentes en cada punto de muestreo, evaluando los resultados obtenidos contra las especificaciones, así mismo realizamos la identificación de género y especie de los microorganismos presentes. Simultáneamente se descargan los datos en los reportes y se realiza un análisis de tendencia.^[19]

5. MONITOREO DE SISTEMA DE AGUA

La finalidad de los monitoreos microbiológicos en los sistemas de agua de tratamiento, purificada, grado inyectable y vapor limpio, es proveer información acerca de la calidad de los procesos de purificación que se utilizan para



FIG. 8. FILTROS DE ALTA PUREZA UTILIZADOS PARA EL AGUA. TOMADO DE [10]

obtener los diferentes grados de agua para la elaboración de productos farmacéuticos estériles y no estériles. Estos monitoreos microbiológicos nos indican los microorganismos presentes en el suministro del agua y si existe un proceso eficaz de purificación. Además, provee los datos necesarios que garantizan la ausencia de microorganismos patógenos; los cuales pueden ocasionar una contaminación en las redes de suministro y que estos alcancen a llegar a los centros de recolección para la elaboración de los productos. A la par, se

van generando resultados de tendencia e identificación de microorganismos presentes, con los cuales en un determinado momento se tomen acciones correctivas y preventivas cuando se generen resultados fuera de especificación.

Dependiendo del grado de purificación del agua es la especificación de presencia o ausencia de microorganismos permisibles, por lo cual los análisis microbiológicos del sistema de agua se pueden realizar mediante dos métodos:

- a) Método de Filtración por membrana
- b) Método de Cuenta en Placa

5.1 Técnica de filtración por membrana:



FIG. 9. MEDIO SELECTIVO CON CRECIMIENTO DE ENTEROBACTERIAS. TOMADO DE [14]

El método de filtración por membrana permite determinar: cuenta total microbiana, presencia o ausencia de coliformes y presencia o ausencia de diferentes especies de *Pseudomonas sp.* o *Burkordelia cepacia*.

Existen medios de cultivos específicos, capaces de permitir el desarrollo microbiano y diferenciar por características morfológicas y fisiológicas los microorganismos de interés. Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio.

La metodología consiste en colocar un disco o membrana filtrante estéril de tamaño de poro especificado en la técnica en la unidad de filtración. Se hace pasar un volumen previamente determinado del agua muestreada por la membrana filtrante y las bacterias serán retenidas en la superficie de dicha membrana.

Se retira el disco filtrante y se coloca sobre cajas Petri con medio de cultivo que permita el crecimiento de microorganismos objetables y patógenos. Posteriormente se procede a un periodo de incubación establecido.

Después de la incubación se desarrollarán colonias sobre la membrana filtrante en cualquier lugar donde hayan quedado bacterias atrapadas durante el proceso de filtración.

Esta técnica tiene muchas aplicaciones útiles, entre las cuales:

1. Se pueden examinar grandes volúmenes de agua; casi cualquier volumen se puede filtrar a través del disco y los microorganismos en general quedarán en él.
2. Se logran estimaciones cuantitativas de ciertos tipos de bacterias, como coliformes, cuando se usan los medios apropiados.

5.2 Análisis sanitario del agua:

El diagnóstico o determinación de las bacterias coliformes en las muestras de agua se basa en la capacidad de dichos microorganismos para producir gas a partir de lactosa. Se inocula parte de la muestra en tubos de fermentación de lactosa y se incuban durante periodos apropiados. Se observan los tubos después de este lapso, y la aparición de gas constituye una prueba positiva de presunción.

La presencia de gas en el tubo de lactosa y la coloración de Gram en la placa inclinada de agar indican bacilos gramnegativos sin esporas, harán que el resultado se designe como prueba positiva completa con respecto a bacterias coliformes.

Son bacterias coliformes las pertenecientes a las enterobacteráceas que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido (Hidrogeno, CO₂). Pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.

Para determinar el número de estas bacterias se suelen emplear medios selectivos. Después de su incubación a aproximadamente 37° C, se halla el número total de coliformes.

La confirmación obligatoria de estos gérmenes requiere su diferenciación por medio de pruebas bioquímicas correspondientes, obteniéndose así género y especie.



FIG. 10. PRUEBA DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA API. TOMADO DE [13]

5.3 Estimación del Número más Probable (NMP):

Se basan estos métodos en la presunción de que las bacterias se hallan normalmente distribuidas en un medio líquido, esto es, en las muestras repetidas del mismo tamaño de un mismo producto. Debe esperarse que contengan el mismo número de gérmenes como promedio; naturalmente, algunas de las muestras pueden contener algunos gérmenes más o menos. La cifra media es el número más probable (Most Probable Number o MPN).

Esta técnica se usa principalmente para la estimación de bacilos coliformes, empleando caldos selectivos, pero puede utilizarse casi para toda clase de gérmenes en muestras líquidas si puede observarse fácilmente el crecimiento.

5.4 Cuenta estándar en placa:

Se efectúan cuentas de colonias después de haber sembrado en la placa cantidades alícuotas de la muestra. La cuenta estándar en placa no se recomienda en el caso del agua porque si esta contiene pocas bacterias patógenas obviamente es más peligrosa que las que contiene muchas saprofitas. Sin embargo, el agua es de buena calidad si posee cuentas bajas, menos de 100 ufc (unidades formadoras de colonia) por mililitro.

5.5 Pruebas para determinar la presencia de bacterias coliformes:

Varios medios selectivos diferenciales facilitan mucho el proceso para examinar muestras de agua en busca de microorganismos coliformes, el examen supone tres pasos sucesivos:

- a) Prueba de presunción: consiste en filtrar la muestra por una membrana y colocarla en medios de enriquecimiento y selectivos.
- b) Prueba de confirmación: consiste en resembrar el crecimiento obtenido en la prueba anterior en medios líquidos y sólidos que por características bioquímicas de los microorganismos indican el tipo de microorganismo presente.
- c) Prueba de identificación: prueba bioquímica que indica género y especie de la biota presente en la muestra

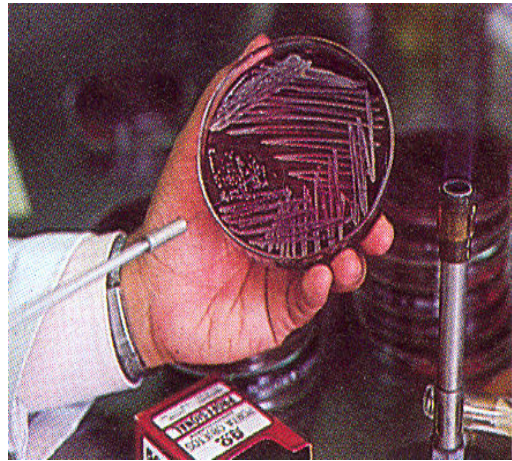


FIG. 11. MEDIO SELECTIVO CON CRECIMIENTO DE ENTEROBACTERIAS. TOMADO DE [14]

Es necesario cuidar los siguientes detalles cuando se sometán muestras de agua a análisis bacteriológicos:

1. La muestra se tomará en frasco estéril.
2. La muestra ha de ser representativa de la fuente original.
3. Se evitará la contaminación de la muestra durante y después de obtenerla.
4. La muestra se analizará lo más pronto posible.
5. Si no es posible examinar la muestra enseguida, deberá guardarse en refrigeración entre 0 y 10 ° C.

Los procedimientos bacteriológicos de rutina son:

- a. Cuenta en placas para determinar el número de bacterias.
- b. Pruebas que revelen la presencia de bacterias coliformes^[16]

6. PRUEBA DE LÍMITES MICROBIANOS

El objetivo principal de este análisis es evaluar la calidad sanitaria de los productos farmacéuticos, en materia prima como en producto intermedio, producto terminado y estabilidades.

Esto se logra con base en el recuento total de microorganismos mesofílicos aerobios, hongos filamentosos y levaduras, completando el estudio con el hallazgo de microorganismos objetables tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella sp.*

Este estudio puede llevarse a cabo siguiendo dos metodologías dependiendo de las características de los productos o materiales a analizar y las cuales se describen a continuación:

6.1 METODO DE FILTRACION POR MEMBRANA



FIG. 12. EQUIPO DE FILTRACION POR MEMBRANA. TOMADO DE [10]

El método de filtración por membrana se deriva de la técnica de filtración que se utiliza en el análisis del sistema de agua visto en el punto 5.1.; con la variante que se realiza una dilución previamente validada del producto o material en análisis, permitiendo así capturar de igual forma en la membrana los microorganismos presentes.

6.1.1 Cuenta de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras.

Posterior al filtrado, se colocan dichas membranas sobre medios de cultivo nutritivo sólido (agares) adecuados para el desarrollo de hongos y aerobios mesofílicos.

Después de un periodo de incubación apropiado y validado, se determina el número total de UFC's obtenido en las membranas considerando el factor de dilución utilizado.

Se realizan los registros correspondientes tomando en cuenta las especificaciones establecidas para cada producto. Paralelamente, se procede a aislar los microorganismos encontrados para su identificación vía tinción de Gram y bioquímica.



FIG. 13. PRUEBA DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA API. TOMADO DE [13]

En caso de tener resultados fuera de especificación, se toman acciones correctivas y/o preventivas oportunamente.

6.1.2 Investigación de microorganismos objetables.

Paralelamente a la cuenta total, se colocan membranas en medios de cultivo de enriquecimiento (líquidos), que permitan el desarrollo de los microorganismos que pudiesen estar presentes en las muestras de análisis.

Al término del periodo de incubación validado, se procede a realizar resiembras con alícuotas establecidas de los caldos nutritivos en medios de cultivo selectivos sólidos y líquidos en busca de microorganismos patógenos.

Se procede a un nuevo periodo de incubación validado de estos medios y al finalizar este lapso, se realizan aislamientos en otros medios de cultivo selectivos los cuales confirmaran su presencia.



FIG. 14. MORFOLOGIA COLONIAL DE MICROORGANISMOS OBJETABLES. TOMADO DE [14]

En caso de obtener crecimiento tanto en los medios sólidos y líquidos, se realiza un aislamiento en medio nutritivo con la finalidad de identificar su género y especie.

Si se llegara a identificar plenamente microorganismos objetables en las muestras de análisis, se realizara una investigación para tomar acciones al respecto.

6.2 METODO DE VACIADO EN PLACA

El método de vaciado en placa se utiliza para los productos y materias primas que no pueden ser filtrados a través de una membrana debido a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales pueden ser inmiscibles o insolubles en agua, viscosas, oleosas, etc.

La metodología consiste en tomar una cantidad en gramos validada de la muestra, la cual se adiciona a medios de cultivo líquidos que permitan el desarrollo microbiano y un agente diluyente.

6.2.1 Cuenta de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras.

De la muestra diluida se toman alícuotas previamente establecidas por validación del producto y se colocan en placas Petri estériles, a las cuales se les adicionara medio de cultivo (medio de enriquecimiento que permita el crecimiento de hongos y bacterias mesofílicas) a una temperatura que no afecte su viabilidad. Se dejan solidificar los agares, se incuban a tiempos y temperaturas validados. Se determina el numero total de UFC's obtenido en las placas considerando el factor de dilución utilizado.

Se realizan los registros correspondientes tomando en cuenta las especificaciones establecidas para cada producto y materia prima. Paralelamente se procede a aislar los microorganismos encontrados para su identificación macroscópica vía tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

En caso de tener resultados fuera de especificación, se toman acciones correctivas y/o preventivas oportunamente.

6.2.2 Investigación de microorganismos objetables.

Paralelamente a la cuenta total, se colocan los medios de cultivo de enriquecimiento (líquidos) en incubación, previa validación.

Al terminó del periodo de incubación, se procede a realizar resiembras con alícuotas establecidas de los caldos nutritivos en medios de cultivo selectivos sólidos y líquidos en busca de microorganismos patógenos.

Se procede a un nuevo periodo de incubación validado de estos medios y al finalizar este lapso, se realizan aislamientos en otros medios de cultivo selectivos los cuales confirmarán su presencia.

En caso de obtener crecimiento tanto en los medios sólidos y líquidos se realiza un aislamiento en medio de enriquecimiento con la finalidad de identificar su género y especie.



FIG. 15. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN MEDIOS DE CULTIVO. TOMADO DE [14]

Si se llegara a identificar plenamente microorganismos objetables en las muestras de análisis se realizará una investigación para tomar acciones al respecto. [17], [23], [24]

7. DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS POR EL METODO DE 2 X 2 PUNTOS

Esta metodología se basa en la comparación obtenida para evaluar la potencia de una muestra de concentración desconocida contra un estándar de referencia, conociendo previamente la concentración de esta.

Para esta prueba se requiere de la preparación del estándar de referencia, el cual como se menciona anteriormente, debe cumplir con requerimientos de estándar primario, otorgado por una entidad reconocida (USP) o en su defecto, su certificación por parte del comité de control de calidad.

Este estándar debe almacenarse en condiciones marcadas en el certificado analítico hasta su preparación para el análisis y asegurar la vida útil del mismo.

7.1 Preparación del estándar de referencia.

Previo al análisis de una muestra, se debe preparar tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- Atemperar el estándar a temperatura ambiente.
- Los pesafiltros donde se colocará el estándar, deben estar a peso constante.
- Después de obtener el peso constante, pesar una cantidad establecida de estándar.
- Someter el estándar bajo las condiciones de temperatura, tiempo y presión atmosférica, las cuales están indicadas en las metodologías farmacopeicas
- Una vez concluidas las condiciones del secado, se procede a retirar la muestra.
- Determinar su pérdida por secado y realizar los cálculos correspondientes para obtener la potencia teórica.
- Este estándar posee una caducidad establecida por la farmacopea.

7.2 Preparación de la suspensión microbiana

Dependiendo del antibiótico a evaluar, se utiliza un microorganismo de referencia establecido farmacopeicamente, el cual debe ser sensible al activo. Para obtener la suspensión microbiana se requiere realizar los siguientes pasos:

- Las transferencias del microorganismo deben provenir de una cepa de referencia certificada ATCC (American Type Culture Collection) o equivalente, la cual en todos sus pases debe ser evidente en morfología e identificación bioquímica para constatar su pureza.

- La activación del microorganismo proveniente de los liofilizados se realiza en medios de cultivo, los cuales proveen nutrientes que permiten el desarrollo de la biomasa necesaria.
- Es necesario obtener una concentración de trabajo establecida, la cual puede ser ajustada por espectrofotometría.
- Esta suspensión ajustada posee una caducidad establecida, previa validación.

7.3 Metodología

La metodología consiste en utilizar el estándar de referencia con una potencia conocida, el cual se diluye a dos niveles de concentración: Alto y Bajo.

Las muestras son tratadas de igual manera que el estándar, obteniendo al final los mismos valores experimentales de concentración.

Es necesario el uso de placas petri que contengan un medio de cultivo de soporte y una capa siembra que incluya al microorganismo de referencia. Los medios de cultivo se encuentran descritos en las farmacopeas dependiendo el antibiótico a evaluar por farmacopeas, y deben de cumplir las pruebas de promoción de crecimiento, pH y esterilidad previo a su uso.

Ambas capas de medio de cultivo deben cumplir con uniformidad y no deben presentar grumos ni agua de condensación. Una vez obtenidas las placas, se procede a la colocación de los discos absorbentes previamente humedecidos con las soluciones del estándar y de la muestra problema mencionadas previamente.

Se incuban estas placas en tiempo y temperatura establecidos previa validación.

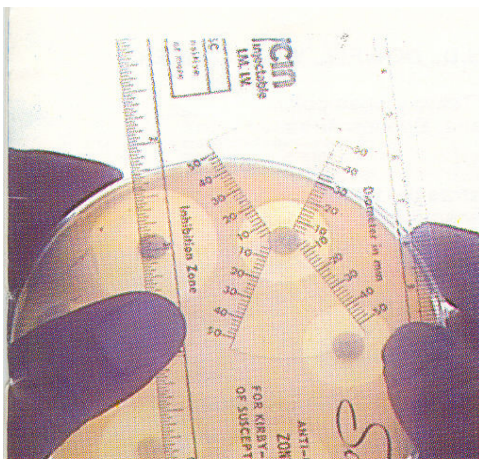


FIG. 16. HALOS DE INHIBICION. TOMADO DE [14]

Concluido este periodo, se retiran las placas de análisis y se realizan las lecturas del diámetro de inhibición que presenten las concentraciones alrededor del disco absorbente.

Se realizan los cálculos para determinar la potencia de la muestra problema. Estos deben cumplir criterios estadísticos.

En caso de que alguno de estos parámetros o la potencia no se encuentren dentro de los criterios establecidos para la aprobación de la muestra de análisis, se realizara una investigación para tomar acciones al respecto.^{[18],[22],[24]}

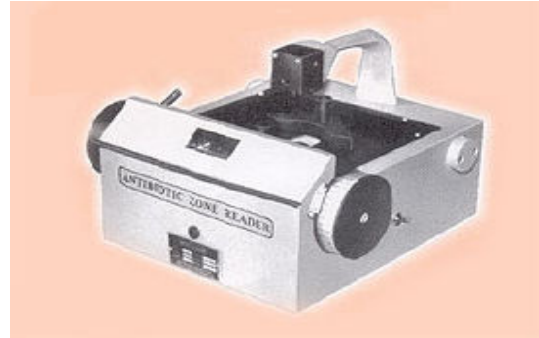


FIG. 17. HALOMETRO. TOMADO DE [8]

8. PRUEBA DE ESTERILIDAD

La prueba tiene como finalidad investigar la presencia de microorganismos viables usando medios de cultivo adecuados. Aplica a sustancias, preparaciones o dispositivos médicos que requieren ser estériles.

La prueba se lleva a cabo en condiciones asépticas usando campanas o módulos de flujo laminar localizados en cuartos limpios, o bien un aislador biológico.

Dependiendo de las características fisicoquímicas de las muestras, se puede realizar de dos formas:

8.1 METODO FILTRABLE

Esta técnica se utiliza cuando la naturaleza del producto lo permite, como es el caso de productos acuosos, oleosos o con base alcohólica que además, sean solubles o miscibles en solventes de las mismas características.

El procedimiento para llevar a cabo el análisis requiere los siguientes parámetros:

- Controles negativos adecuados.
- Aisladores biológicos y/o equipo de filtración.
- Cantidad de muestra previamente establecida para el análisis.
- Pruebas de validación de la técnica por producto y concentración.
- Medios de cultivo y soluciones de enjuague que cumplan pruebas de promoción de crecimiento, esterilidad y pH.
- Unidades de filtración estériles y con caducidad vigente.

Este análisis se realiza en aisladores biológicos o equipos de filtración dentro de un ambiente aséptico. Para la filtración de las muestras se utilizan canastillas estériles, las cuales contienen una membrana con tamaño de poro determinado, que permitirán la retención de los probables microorganismos que estén presentes.



FIG. 18. AISLADORES BIOLÓGICOS. TOMADO DE [4]

Una vez concluido esto, se utilizan soluciones de enjuague que arrastren la totalidad de la muestra. En caso de que el producto a analizar contenga actividad antimicrobiana, los enjuagues pueden contener agentes neutralizantes que eliminen dicha actividad.

Se sellan las canastillas y se hace la transferencia de los medios de cultivo que permitan el desarrollo de microorganismos aerobios y anaerobios, así como de hongos y levaduras.

Se incuban las muestras a temperaturas y tiempos establecidos en las farmacopeas que propicien el desarrollo microbiano.

Las muestras en incubación se observan periódicamente para detectar la presencia o ausencia de turbidez, la cual nos indicará contaminación microbiana.

En caso de presentarse contaminación durante o al final del periodo, se procederá a una investigación para determinar el género y especie del o los microorganismos contaminantes.

8.2 METODO DIRECTO

La técnica del método directo se utiliza para aquellos productos o materiales que no sean solubles o miscibles en solventes acuosos u oleosos, además de materiales de empaque como son agujas, tapones, frascos, insertos, etc. que se encuentren en contacto directo con el producto estéril.



FIG. 19. MEDIOS DE CULTIVO PARA PRUEBA DE ESTERILIDAD. TOMADO DE [5]

El método se lleva a cabo transfiriendo la cantidad de muestra o de materiales a ser analizados directamente en los medios de cultivo, de tal forma que el volumen de la muestra no sea mayor del 10% y para asegurar que todas las partes del material se encuentren en contacto con el medio de cultivo, sumergir un número apropiado de las unidades en el volumen establecido.

Incubar en condiciones establecidas de acuerdo a las normas de la farmacopea con observación periódica hasta su conclusión. En caso de presentarse contaminación durante o al final de la incubación, se procede con una investigación para determinar el género y especie del o los microorganismos contaminantes. ^{[15], [24]}

9. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS MICROBIOLOGICOS

El objetivo principal de validar una técnica de análisis, consiste en obtener evidencia documentada que permita confirmar que los resultados obtenidos son confiables y reproducibles. La validación de métodos analíticos se basa en normas emitidas por entidades regulatorias como la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y políticas que apliquen a todas las subsidiarias reguladas por la Food and Drug Administration (FDA) operadas por las divisiones de Schering-Plough, quienes a nivel mundial establecen los parámetros necesarios para obtener productos de alta calidad.

La validación de una técnica es el proceso por el cual se establecen mediante estudios de laboratorio que las características de desempeño de método analítico cumplen los requerimientos para la aplicación analítica propuesta, siendo su principal objetivo confirmar y documentar que los resultados producidos son confiables.

Por medio de la validación se establecen los parámetros estándares para el método tales como sensibilidad, especificidad, precisión, exactitud, linealidad y robustez. La validación envuelve un número de actividades y cantidad de datos, con un análisis subsecuente de los datos usando una estadística apropiada. La validación incluye estudio del campo, comparación con otros métodos, comparación con estándares de referencia, estudios colaborativos con otras subsidiarias usando el mismo método o procedimientos, reproducción de datos a partir de un método estándar aceptado, o de una publicación reconocida, estudios experimentales, etc.

Basándose en la necesidad de obtener productos de óptima calidad que cumplan con todas las normas establecidas y la importancia de manejar los parámetros que están involucrados en las técnicas de análisis de productos farmacéuticos se desarrollan los proyectos para buscar validar las pruebas microbiológicas.

9.1 METODOLOGIA

Se debe hacer una revisión de todos los factores que influyen en la validez de la prueba, de acuerdo a lo siguiente:

- Las técnicas empleadas deben estar acordes y actualizadas con las exigencias de entidades gubernamentales encargadas de la seguridad de los productos.
- Los equipos deben encontrarse dentro del programa preventivo y correctivo de la empresa, además deben estar calibrados y calificados.
- El personal debe estar calificado y con experiencia en el control de calidad de los productos y en especial en el desarrollo de la técnica.
- Las instalaciones deben estar ubicadas, construidas y mantenidas de tal forma que sean apropiadas para las operaciones que se realizaran en ellas.

9.1.1 CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son analizados en cuanto a características como pH, esterilidad y promoción de crecimiento. Se espera que el medio cumpla con las características estipuladas por las casas comerciales y además que tenga la habilidad de soportar crecimiento en ausencia del material de prueba con una cantidad de organismos viables entre 10-100 UFC's que es lo sugerido por la ATCC. Para esto se prepara una suspensión que contenga ente 10 y 100 UFC's, se inoculan los medios de cultivo y se procede a incubar de acuerdo con temperaturas y tiempos establecidos por las normas oficiales antes mencionadas.

9.1.2 VALIDACION DE BACTERISOTASIS Y FUNGISTASIS

En esta prueba se busca asegurar que la actividad bacteriostática y fungistática del producto no afecta la veracidad de la prueba. Además, se busca conocer la cantidad de medio de cultivo requerido en la prueba de esterilidad por inoculación directa y la cantidad de lavados para la técnica de filtración por membrana.

Existen dos metodologías para la validación de el método I; se refiere a la validación utilizando la filtración por membrana y el método II a la validación utilizando la inoculación directa.

➤ METODO I

Hacer el pool del producto a probar y su respectivo tratamiento.

Filtrar la cantidad de producto de prueba.

Lavar la membrana de filtración con el diluyente apropiado.

Hacer un último lavado con el mismo diluyente que contenga una cantidad de organismos viables entre 10 y 100 UFC.

Repetir el proceso de filtración como control positivo para el diluyente, en otra membrana de filtración que no haya sido expuesta al microorganismo empleado en la prueba.

Tomar las membranas en condiciones estériles, sembrarlas en los medios apropiados para el microorganismo y llevarlas a incubar.

➤ METODO II

Hacer el pool del producto a probar y su respectivo tratamiento.

Inocular los medios de cultivos utilizados en la prueba con una suspensión que contenga entre 10 y 100 UFC's.

En uno de los dos frascos que contienen medio de cultivo, inocular la cantidad de producto apropiada en la proporción indicada (Ej. Dilución 1:10).

En otro frasco de medio de cultivo inoculado con una suspensión que contenga entre 10 y 100 UFC's es el control positivo.

Llevar a incubar durante el periodo establecido en la normas regulatorias antes mencionadas.

En ambos métodos se evalúan los resultados por similitud o diferencia entre la turbidez (crecimiento microbiano) de la muestra del producto y la del control positivo, las cuales deben ser similares. De no ser así, se aumenta el número de los lavados en el método de filtración por membrana y la cantidad de medio para el método de inoculación directa, establecidos por entidades regulatorias.

9.1.3 VALIDACION DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD

➤ INOCULACION DIRECTA

Hacer control microbiológico del aire de la cabina.

Limpiar con desinfectante y ubicar los materiales que se van a utilizar en cabina (medios de cultivo, muestras).

Destapar los frascos del producto a analizar y agitar.

Inocular dos de los frascos con una dilución entre 10 y 100 UFC's del microorganismo de prueba.

Agitar por 20 min.

Agregar la cantidad de producto establecido previamente en cada uno de los frascos con medio dispuesto para la recuperación de bacterias y hongos. Además sembrar microorganismos controles.

Llevar a incubar los medios a temperaturas y tiempos según normas oficiales.

Criterios de aceptación:

Aceptar el lote y reportar la prueba como satisfactoria si hay evidencia de crecimiento microbiano en los medios de cultivo.

Reportar la prueba como no satisfactoria si la prueba evidencia la ausencia de crecimiento microbiano, proceder a investigar las posibles causas y repetir la prueba.

➤ FILTRACION POR MEMBRANA

Hacer control microbiológico del aire de la cabina.

Limpiar con desinfectante y ubicar los materiales que se van a utilizar en cabina (medios de cultivo, muestras, Steritest Compact).

Destapar los frascos del producto a analizar y agitar.

Agregar la cantidad de producto establecido previamente en cada una de las canastillas.

Inocular las canastillas con una dilución entre 10 y 100 UFC's del microorganismo de prueba.

Filtrar la muestra con ayuda de una bomba de vacío.

Lavar con el diluyente de prueba y adicionar el medio de cultivo propicio para el crecimiento microbiano.

Agregar medio de cultivo dispuesto para la recuperación de bacterias y hongos. Además sembrar microorganismos controles.

Llevarlas a incubar a temperaturas y tiempos según normas oficiales.



FIG. 20. EQUIPO DE FILTRACION PARA PRUEBA DE ESTERILIDAD (STERITEST COMPACT®). TOMADO DE [10]

Criterios de aceptación:

Aceptar el lote y reportar la prueba como satisfactoria si hay evidencia de crecimiento microbiano en los medios de cultivo.

Reportar la prueba como no satisfactoria si la prueba evidencia la ausencia de crecimiento microbiano, proceder a investigar las posibles causas y repetir la prueba.

10. CONCLUSIONES:

En el presente trabajo se describió una serie de actividades realizadas por el sustentante con el propósito de dar a conocer las técnicas analíticas microbiológicas requeridas por el área de control de calidad para la evaluación de los medicamentos que comercializan los laboratorios farmacéuticos.

Con lo cual es posible concluir que el control de calidad requiere de:

1. Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio en cada paso de los análisis, esto incluye la documentación y el registro al momento de su ejecución, así como las buenas prácticas en Seguridad y Ecología.
2. Evaluar constantemente los ambientes en los cuales se llevan a cabo la fabricación, llenado y acondicionamiento de los productos, así como de áreas de análisis, laboratorios y personal que en ellos labore.
3. Llevar a cabo monitoreos de los sistemas de agua, especialmente la que es utilizada para la fabricación de productos oftálmicos y parenterales; ya que esta posee un mayor impacto sobre el producto; dadas sus características y sus estrictas especificaciones.
4. Cuantificar y determinar la biota microbiana y microorganismos objetables en los productos por la técnica de límites microbianos; la cual es un pilar en la aprobación o rechazo de un lote de producto.
5. Cuantificar el porcentaje en la potencia de activos (antibióticos) para conocer si el producto posee el efecto para el cual fue diseñado.
6. Demostrar analíticamente la esterilidad de los productos por medios de filtración y/o inoculación directa en medios específicos, demostrando presencia o ausencia de contaminantes.
7. Obtener evidencia documentada de las pruebas de validación que demuestren que son reproducibles, confiables y sólidas; lo cual se reporta bajo el concepto de técnicas validadas.
8. Una capacitación oportuna del personal tanto en la realización de las pruebas como en las buenas practicas de laboratorio minimiza los riesgos y garantiza la obtención de resultados confiables.
9. Un mantenimiento preventivo de los equipos garantiza seguridad en el procedimiento de la prueba.
10. Para que los resultados de las pruebas microbiológicas tengan validez es necesario demostrar que los medios de cultivo empleados contienen los nutrientes necesarios para inducir el crecimiento de los microorganismos.
11. Es preciso controlar todos los factores extrínsecos que puedan afectar la veracidad de las pruebas especialmente, la temperatura, aireación y la asepsia operacional, ya que estos influyen de manera determinante en la manifestación de falsos positivos en los resultados de las pruebas.
12. Por ultimo, el empleo de controles microbiológicos positivos dentro de las pruebas corrobora la efectividad y sensibilidad de las técnicas.

11. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- [1] Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Química. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [2] www.escprojects.co.uk. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [3] Irving Analytical Laboratories. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [4] Lancaster Laboratories. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [5] Beckton-Dickinson. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [6] Sterility and Quality Assurance Consulting, Inc. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [7] Afton Scientific Corporation. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [8] snsvo2.seekandsource.com. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [9] www.sciequip.com.cn. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [10] Millipore Corporation. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [11] Analitica Institucional. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [12] Biotest. UK. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [13] Biomerieux. Fecha de revisión: 20 de Mayo de 2006
- [14] Escobar G.A., Atlas de Bacteriología, Ed. GALO, Vol. 10, pag. 113-124, México D.F., Distribuido por Scheramex.
- [15] International Analytical Procedure No. 4, Sterility Test Procedure. The information contained herein is the property of Schering Corporation (USA). It is secret and or confidential.
- [16] International Analytical Procedure No. 10, Analysis of Water. The information contained herein is the property of Schering Corporation (USA). It is secret and or confidential.
- [17] International Analytical Procedure 24, Microbial Limits Test. The information contained herein is the property of Schering Corporation (USA). It is secret and or confidential.
- [18] International Analytical Procedure 43, Gentamicin Potency Determination. The information contained herein is the property of Schering Corporation (USA). It is secret and or confidential.
- [19] Schering-Plough World Wide Quality Standard 10,408. Environmental Monitoring Program Requirements. The information contained herein is the property of Schering Corporation (USA). It is secret and or confidential.
- [20] Schering-Plough World Wide Quality Standard 10,405. Method Validation. The information contained herein is the property of Schering Corporation (USA). It is secret and or confidential.
- [21] 2005 United States Pharmacopeia and National Formulary (USP/NF) 28/23, General Chapter <1225> Validation Compendial Methods.
- [22] 2005 United States Pharmacopeia and National Formulary (USP/NF) 28/23, General Chapter <81> Antibiotics-Microbial Assays.
- [23] 2005 United States Pharmacopeia and National Formulary (USP/NF) 28/23, General Chapter <61> Microbial Limit Test.

[24] 2004 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 8va. Edición, MGA 313 Métodos Generales de Análisis, <0100> Valoración Microbiológica de Antibióticos, <0381> Esterilidad, <0571> Límites Microbianos, <0921> Tinciones Bacterianas.

12. APENDICE

Aisladores Biológicos: Equipos herméticos que permiten ambientes estériles donde se llevan a cabo las pruebas de esterilidad.

Bacteriostasis: Detención del crecimiento bacteriano, su reproducción o ambas cosas.

Biota: Designa al conjunto de microorganismos que ocupan un área dada.

Diluyente: Solución necesaria para disminuir una concentración determinada.

Fungistasis: Detención del crecimiento de hongos, su reproducción o ambas cosas.

Halómetro: Instrumento que permite medir los diámetros de inhibición.

Halos de inhibición: Respuesta generada por la susceptibilidad a una concentración determinada de antibiótico por parte del microorganismo de prueba.

Medios Diferenciales: Permiten distinguir los microorganismos que crecen en ellos por diferencias en una actividad metabólica que en general se pone de manifiesto por una coloración, precipitación o hemólisis.

Medios de Enriquecimiento: Promueven el desarrollo preferencial de un grupo o tipo de microorganismo escaso en la muestra o inhibiendo el de organismos abundantes sin ningún interés en particular.

Medios Selectivos: Que tienen uno o mas componentes en su formulación que inhibe a ciertos grupos de microorganismos permitiendo el crecimiento de otros.

Microorganismo Objetable: Microorganismo que puede ser potencialmente dañino al producto o al consumidor.

Patógeno: El significado esta en que el parásito tiene atributos que le permiten invadir y hacer daño a su huésped, este ultimo opone resistencia a una serie de microorganismos, limitando su acción y las características determinantes de la patogenicidad son invasividad y toxigenicidad.

Pool de Producto: Mezcla representativa de un numero determinado de piezas de un lote de producto fabricado.

Pruebas Bioquímicas: Consisten en pruebas metabólicas que permiten llegar a la caracterización de un microorganismo dado. El metabolismo es la suma de todos los procesos químicos que ocurren dentro de un individuo y para su estudio se divide en anabolismo y catabolismo. El primero se refiere a las reacciones bioquímicas que suceden en la célula para formar macromoléculas y el segundo representa las reacciones que están involucradas en la conversión de sustratos a formas más simples y generalmente más oxidadas con la que se obtiene la energía requerida para el anabolismo.

Saprófito: (del griego σάπρος, *saprós*, "podredumbre" y φυτός, *fitos*, "planta") es un organismo heterótrofo vegetal que obtiene su energía de materia orgánica muerta o de los detritos desechados por otros seres vivos, de los cuales extrae los compuestos orgánicos que requiere como nutrientes.

Unidad Formadora de Colonias (UFC's): Una colonia se desarrolla en un medio sólido y procede de una sola bacteria, espora o agrupación de microorganismos de la misma especie.

Vapor Limpio: Producido por un generador de vapor, el cual requiere especificaciones de agua grado inyectable. Las industrias farmacéuticas lo utilizan para esterilizar materiales porosos que deben cumplir con lineamientos internacionales como gases no condensables, secos y de supercalentamiento.