



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE
FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS
NO ESTÉRILES**

T E S I N A

Que para obtener el título de
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Kristela Esquivel de Jesús

A S E S O R

Luis Rodrigo Padilla Blanco



Ciudad de México a 21 de septiembre de 2021



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	María del Socorro Alpízar Ramos
VOCAL	Lauro Misael Del Rivero Ramírez
SECRETARIO	Luis Rodrigo Padilla Blanco
PRIMER SUPLENTE	Elvia Sosa Zavala
SEGUNDO SUPLENTE	Rosa María Rosete Álvarez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Productos Medix S.A. de C.V.

ASESOR DE TESINA:

Luis Rodrigo Padilla Blanco

SUSTENTANTE:

Kristela Esquivel de Jesús

ÍNDICE

1. Introducción	4
2. Justificación	5
3. Objetivos	6
4. Antecedentes	7
5. Metodología	21
6. Resultados	29
7. Discusión	32
8. Conclusiones	35
9. Bibliografía	37
ANEXO 1. Abreviaturas y definiciones	40
ANEXO 2. Materiales	43
ANEXO 3. Preparación de soluciones	44
ANEXO 4. Sistema API®	45
ANEXO 5. Microorganismos de prueba	52

- 1 -
INTRODUCCIÓN

Productos Medix S.A. de C.V. es una empresa 100% mexicana, dedicada a la investigación, desarrollo, fabricación y comercialización de productos farmacéuticos. Es líder en México en el tratamiento del sobrepeso y obesidad (ver Figura 1), no solo por los años de experiencia en el campo clínico, sino por el compromiso constante en buscar soluciones integrales que permiten responder a las necesidades de los clientes, con los cuales se contribuye a disminuir el impacto y gravedad de estos padecimientos, en beneficio de la salud de la población.



Figura 1. Fachada de la empresa. Obtenida de <https://www.google.com.mx/maps>

Parte fundamental de las actividades de la empresa es el Control de Calidad de los medicamentos. Este control ayuda a garantizar la efectividad y la inocuidad de los productos, de manera que su correcta aplicación y conocimiento es de extrema importancia para la industria.

Las principales actividades realizadas en esta área son el análisis de límites microbianos de formas farmacéuticas sólidas no estériles (preparación de medios de cultivo, prueba de calidad de medios de cultivo, promoción de crecimiento de medios de cultivo, conservación de cepas ATCC como son *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; y esterilización de material por calor húmedo), monitoreos microbiológicos ambientales, de personal y superficies de equipos; muestreo de sistemas críticos como son agua, HVAC y aire comprimido; soporte documental como son la generación de reportes de análisis, certificados, protocolos y bitácoras; y manejo de auditorías internas y externas ante autoridades sanitarias como lo es COFEPRIS.

El presente trabajo tiene como finalidad describir los conocimientos y habilidades adquiridos durante la práctica profesional a lo largo de dos años, incluyendo los procesos de mejora continua que permiten reducir tiempos, costos e impactos ambientales.

Con base en los requerimientos oficiales como lo son las normas NOM-092-SSA1-1994, NOM-210-SSA1-2014, NOM-059-SSA1-2013 y farmacopeas vigentes (FEUM, USP y EP), se describe la metodología empleada para límites microbianos, identificando los diversos factores que pudieran intervenir en los resultados, mitigándolos con controles positivos y negativos.

Al ser un análisis obligatorio y de rutina para cualquier producto farmacéutico sólido no estéril, se pretende simplificar el entendimiento de la metodología de límites microbianos, sirviendo de guía para quienes decidan comenzar una carrera profesional en la industria farmacéutica, en particular en el área de control microbiológico, sugiriendo como realizar la identificación de controles y que precauciones se deben tomar para evitar cualquier posible fuente de contaminación, brindando eficacia, seguridad y reproducibilidad en los resultados. Así mismo se busca concientizar al profesional que realice dicha actividad sobre la criticidad de este.

En el presente trabajo se clasificaron las muestras analizadas en producto de línea, maquila u hormonal, así como por su etapa de fabricación, número de muestras ingresadas para análisis y cuantas de ellas presentaron algún tipo de crecimiento microbiano; en este último caso se procedió a realizar la identificación del microorganismo en cuestión, su impacto en la salud e investigación de las posibles causas de su presencia en el producto de estudio.

- 2 -

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo es funcional para el profesional que se dedica al área de microbiología en la industria farmacéutica, ya que es un análisis rutinario que es requerido para cada producto sólido no estéril que se desee comercializar. De esta forma el profesional podrá realizar de una manera más rápida y simple el análisis, poniendo en práctica las precauciones y medidas que en la experiencia profesional son de ayuda para obtener resultados seguros y confiables.

La industria farmacéutica representa en promedio 1.2% del PIB nacional y 7.2% del PIB manufacturero³¹, además de generar cientos de miles de empleos y producir una amplia gama de medicamentos de diversas formas farmacéuticas y principios activos que ayudan a mejorar la calidad de vida de los mexicanos. Además, busca constantemente la innovación para desarrollar nuevas y mejores moléculas que incrementan la

competitividad del mercado y del país. Los beneficios que el presente trabajo pretenden proporcionar son:

2.1 Para la industria farmacéutica.

El ahorro de tiempo de capacitación, costos y reprocesos del personal que labore en el área de microbiología, evitando falsos positivos o negativos, y brindando seguridad al momento de emitir los resultados del análisis de límites microbianos de las muestras analizadas.

2.2 Para los consumidores de medicamentos.

La seguridad de que el medicamento que están consumiendo está cumpliendo con los estándares de calidad requeridos y que el análisis al que fueron sometidos fue realizado de manera correcta, evitando los daños que pudieran resultar de consumir un sólido contaminado con microorganismos.

2.3 Para los estudiantes y nuevos profesionales.

Una guía práctica que les permitirá conocer a detalle el proceso en la industria farmacéutica y, con ello, mejorará su desempeño en la práctica profesional.

- 3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Generar una guía práctica y completa del proceso de análisis microbiológico de sólidos no estériles para su consulta por los profesionales farmacéuticos y contribuir al aseguramiento de la calidad e inocuidad de estas formas farmacéuticas en el mercado mexicano.

3.2 Objetivos particulares.

3.2.1 Primer objetivo particular.

Describir las generalidades del proceso de control de calidad en la industria farmacéutica y la metodología del análisis microbiológico de sólidos no estériles y sus indicadores asociados.

3.2.2 Segundo objetivo particular.

Generar una guía práctica, ilustrada y complementada por el conocimiento del ejercicio profesional sobre la aplicación de la metodología.

– 4 –

ANTECEDENTES

4.1 Importancia en la industria farmacéutica.

La fabricación de productos farmacéuticos está sujeta a requisitos estrictos de producción y control, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación microbiológica y/o química. El cumplir este objetivo depende principalmente de la aptitud, destreza y capacitación del personal involucrado, de las instalaciones y equipo adecuado, y de la aplicación de buenas prácticas de fabricación a lo largo de los procesos productivos.

La contaminación microbiana está condicionada con la calidad de los insumos, la correcta validación de los procesos de sanitización y limpieza del equipo utilizado en la fabricación, la calidad del aire y del material utilizado. Sin embargo, está comprobado que la principal fuente de contaminación es el personal involucrado en los diferentes procesos.

Las buenas prácticas de fabricación, la capacitación del personal y la supervisión de los procesos, ejercen un papel esencial sobre el control de contaminación de este. El proceso en condiciones asépticas es la actividad más crítica que se lleva a cabo en ambientes microbiológicamente controlados y en los cuales los fabricantes deben poner especial atención a cada detalle que ponga en riesgo al producto. Una rigurosa disciplina y estricta supervisión del personal son esenciales para asegurar que las condiciones ambientales sean apropiadas en cada proceso.

La capacitación de todo el personal que trabaja en ambientes controlados es crítica. Esta capacitación es igualmente importante para el personal responsable del programa de monitoreo microbiano, debido a que la contaminación de la zona de trabajo limpia podría ocurrir inadvertidamente durante el muestreo microbiano. En operaciones altamente automatizadas, el personal encargado del monitoreo pueden ser los empleados que tienen contacto más directo con zonas y superficies críticas dentro del área de procesamiento.

El muestreo microbiológico tiene el potencial de contribuir con contaminación microbiana ocasionadas por técnicas de muestreo o por la ubicación del personal dentro o cerca de la zona crítica. Se requiere un programa formal de capacitación para minimizar este riesgo. Dicha capacitación debe ser documentada para todo el personal que ingresa a los ambientes controlados (ver Anexo 1 para abreviaturas y definiciones).

La calidad microbiológica de los productos farmacéuticos no estériles se determina mediante el recuento de los Organismos Mesofílicos Aerobios (OMA) y de Hongos filamentosos y Levaduras (HL), así como la investigación de microorganismos específicos en función de la vía de administración. Este método no es aplicable en productos que contienen microorganismos viables como principio activo.

Es importante la identificación del recuento total de los contaminantes, para determinar las posibles fuentes de contaminación. Por lo general las bacterias Gram-negativas son indicadoras de problemas de contaminación con el agua, los cocos Gram-positivos indican una contaminación de uso dérmico o mucoso y los bacilos Gram-positivos esporulados, levaduras y hongos son indicadores de contaminación por superficies inertes como son el suelo, techo y paredes.

Para evitar el riesgo de contaminación, cada uno de los aspectos de fabricación deben ir acompañados de un proceso de limpieza y sanitización, con el fin de reducir la presencia de sustancias químicas, orgánicas y de microorganismos. Estos procesos deben abarcar al personal, instalaciones, equipos, material, equipos de limpieza y de sanitización, y todo aquello que pueda llegar a ser una fuente de contaminación del producto.

Los ambientes limpios deben certificarse de acuerdo con lo descrito en la ISO 14644 para que cumplan con los requisitos de la clasificación de diseño. La clasificación de las áreas productivas debe cumplir con los parámetros establecidos en la NOM-059-SSA1-2013.

4.2 Control de Calidad.

En el proceso de fabricación de los productos farmacéuticos no estériles, existen etapas que lo hacen susceptible de contaminación con microorganismos que pueden derivar en el deterioro del producto. Por tal motivo una consecuencia de la contaminación en los productos farmacéuticos de prioridad importancia, es el riesgo que representa para la salud del usuario y que se relaciona directamente con la capacidad de infectar o causar una enfermedad debida al microorganismo contaminante, patógeno u oportunista; además de que un exceso en la carga microbiana puede causar cambios en las características físicas y químicas del producto disminuyendo su seguridad haciendo lo no apto para ser usado.

De ser requerido se lleva a cabo una evaluación basada en el riesgo de los factores pertinentes con personal que posea el entrenamiento especializado en microbiología e interpretación de datos microbiológicos. Para insumos, la evaluación considera al proceso al que se somete el producto, la tecnología actual para la realización de pruebas, así como la disponibilidad de materiales de calidad deseados.

Debido a lo anterior, todos los insumos que participan en la elaboración de estos productos, producto intermedio, producto a granel, producto semiterminado y producto terminado, deben someterse a un análisis microbiológico que demuestre su inocuidad, cumpliendo con ciertas especificaciones que fueron establecidas por organismos oficiales o algunas especificaciones no oficiales tal como es el método de validación de métodos microbiológicos, que fueron establecidas para conveniencia del producto y con las cuales se garantiza que los productos son adecuados para el uso al que fueron destinados.

Este análisis o control microbiológico de sólidos no estériles, implica la realización de dos tipos de pruebas:

Este análisis o control microbiológico de sólidos no estériles, implica la realización de dos tipos de pruebas:

4.2.1 Recuento microbiano refiriéndose básicamente a bacterias mesofílicas aerobias, hongos y levaduras.

A este tipo de análisis se le conoce como límites microbianos los cuales son grupos microbiológicos cuya presencia y número son usados como indicador del manejo y la calidad microbiológica de los productos farmacéuticos. Algunas características que deben cumplir estos grupos microbianos son:

- a) Estar presentes y ser detectables en el producto cuya calidad se está evaluando.
- b) Su crecimiento y concentración deben correlacionar negativamente con la calidad del producto (menor concentración mayor calidad).
- c) Ser fáciles de detectar y enumerar.
- d) Ser claramente distinguibles de otros microorganismos.
- e) Poder ser enumerados en corto tiempo.

4.2.2 La investigación de microorganismos patógenos específicos, como son *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Los Microorganismos específicos pueden ser patógenos, es decir que producen alguna enfermedad y/o pueden causar daño y por lo tanto no deben estar presentes en los productos farmacéuticos. Los microorganismos específicos que se buscan en los productos farmacéuticos son el grupo de bacterias Gram-negativas tolerantes a la bilis: *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Clostridium spp*. A continuación, se detalla la información de estos microorganismos:

4.2.2.1 *Escherichia coli*.

Pertenece al grupo de las enterobacterias, es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, no esporulado que habita normalmente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente y desempeña un importante papel en la fisiología del intestino. La distribución en el ambiente está determinada por su presencia en el intestino. Por ser un habitante regular y normal del intestino se usa el mejor indicador de contaminación con materia fecal de los alimentos.

4.2.2.2 *Salmonella spp.*

Es uno de los patógenos Gram-negativo en forma de bacilo, más puede ser aislado del medio ambiente, agua, tierra, vegetales, animales domésticos y silvestres, humanos y utensilios. Los alimentos principalmente involucrados con la presencia de *Salmonella spp* son: productos cárnicos, lácteos, pescados, mariscos y verduras.

4.2.2.3 *Staphylococcus aureus*.

Son Gram-positivas, no móviles, esféricas y generalmente dispuestas en racimos irregulares. El crecimiento de *S. aureus* es acompañado por la producción de algunos compuestos extracelulares tales como hemolisinas, nucleasas, coagulasas, lipasas y enterotoxinas. Estas enterotoxinas pueden causar intoxicaciones producidas en gran mayoría por *S. aureus* coagulasa positivas.

4.2.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*.

Es una bacteria Gram-negativa en forma de bacilo, perteneciente a la rama y de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias. Se encuentra ampliamente distribuida y se puede aislar de muestras de suelo, aguas contaminadas, plantas y animales.

4.2.2.5 *Candida albicans*.

Es un hongo diploide asexual (forma de levadura). Saprófito de la familia de los Sacaromicetos. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.

Los hongos y levaduras se encuentran comúnmente en el ambiente, y son distribuidos por aire y polvo. Son útiles para evidenciar el grado de contaminación que los mesofílicos aerobios no han podido evidenciar.

Los criterios de aceptación para productos farmacéuticos no estériles basados en el recuento total de microorganismos aerobios y el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras se representa en la Tabla 1 y se basan en los resultados individuales o en el promedio de los resultados en caso de que se realicen por duplicado.

Tabla 1. *Criterios de aceptación para productos farmacéuticos no estériles.*

Vía de administración	Recuento total de microorganismos aerobios (UFC/g o UFC/mL)	Recuento total combinado de Hongos filamentosos y Levaduras (UFC/g o UFC/mL)	Microorganismo(s) Específicos Ausencia (1 g o 1 mL)
Preparaciones no acuosas para uso oral	10 ³	10 ²	<i>Escherichia coli</i>
Preparaciones acuosas para uso oral	10 ²	10 ¹	<i>Escherichia coli</i>
Uso vaginal	10 ²	10 ¹	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11.^a edición.

Estas pruebas deben realizarse bajo condiciones asépticas; el tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta su incorporación en el medio de cultivo no debe exceder 1 hora; las muestras de prueba deben incubarse de 30 a 35 °C de 3 a 5 días para la determinación de bacterias y de 20 a 25 °C por un periodo de 5 a 7 días para hongos y levaduras. Si el producto de prueba tiene actividad antimicrobiana, se debe eliminar o neutralizar hasta donde sea posible. Si se usan sustancias tensoactivas para preparar la muestra, se debe demostrar la ausencia de toxicidad para los microorganismos y su compatibilidad con los neutralizantes utilizados.

De ser requerido se lleva a cabo una evaluación basada en el riesgo de los factores pertinentes con personal que posea el entrenamiento especializado en microbiología e interpretación de datos microbiológicos. Para los insumos, la evaluación considera al proceso al que se somete el producto, la tecnología actual para la realización de pruebas, así como la disponibilidad de materiales de calidad deseados.

4.3 Etapas de fabricación.

Los procesos de fabricación en los que se lleva a cabo el análisis microbiológico son los insumos (materias primas y material de empaque primario); el producto intermedio (mezcla de los excipientes con el o los principios activos); el producto a granel (tableteado o encapsulado); el producto semiterminado (producto colocado en su empaque primario, ya sea blíster o frasco); y el producto terminado, que es el proceso donde se coloca el producto en su envase secundario, como son las cajas de cartón.

4.4 Formas farmacéuticas.

En la industria farmacéutica pueden existir formas farmacéuticas estériles y formas farmacéuticas no estériles. A continuación, se describen las generalidades de ambas formas:

4.4.1 Formas farmacéuticas estériles.

En las formas farmacéuticas estériles son aquellos preparados que están exentos de contaminantes bacterianos, debido a que estos están diseñados para ser introducidos al interior del organismo a través de la vía parenteral, intravenosa o en contacto con mucosas. Para ello es primordial la prueba de esterilidad la cual debe ser validada para el o los productos a analizar. Las muestras tomadas para pruebas de esterilidad deben ser representativas de la totalidad del lote, pero, en particular, tienen que incluir muestras tomadas de partes del lote que se consideren expuestas a mayor riesgo de contaminación, por ejemplo; para los productos que se han llenado asépticamente, las muestras deben incluir contenedores llenados al principio y al final del lote y después de cualquier interrupción significativa de trabajo; para los productos que han sido esterilizados por calor en sus envases finales, se debe considerar tomar muestras de esa parte de la carga que es potencialmente la más fresca.

La esterilidad del producto terminado está garantizada por la validación del ciclo de esterilización en el caso de los productos terminalmente esterilizados, y por pruebas de simulación de proceso o llenado aséptico simulado para corridas de productos procesados asépticamente. Los registros de procesamiento por lotes y, en el caso de procesamiento aséptico, los registros de la calidad ambiental se deben examinar en conjunto con los resultados de las pruebas de esterilidad.

El procedimiento de prueba de esterilidad se tiene que validar para cada uno de los productos determinados.

4.4.2 Formas farmacéuticas sólidas no estériles.

La forma farmacéutica es la disposición física que se da a los fármacos y aditivos para constituir un medicamento y facilitar su administración y dosificación. Las principales formas farmacéuticas analizadas en este trabajo son las cápsulas y las tabletas o comprimidos.

4.4.2.1 Tableta o comprimido.

Consisten en una mezcla de polvos que son sometidos a presión por un punzón dentro de una matriz mediante una máquina tableteadora (ver Figura 2). Tienen forma cilíndrica, con bordes bien definidos y superficie áspera al tacto. Las tabletas de uso oral pueden traer un recubrimiento (comprimidos recubiertos) que tiene por objeto: enmascarar el sabor del fármaco, proteger de la luz y humedad o evitar su desintegración en el estómago (entéricas).

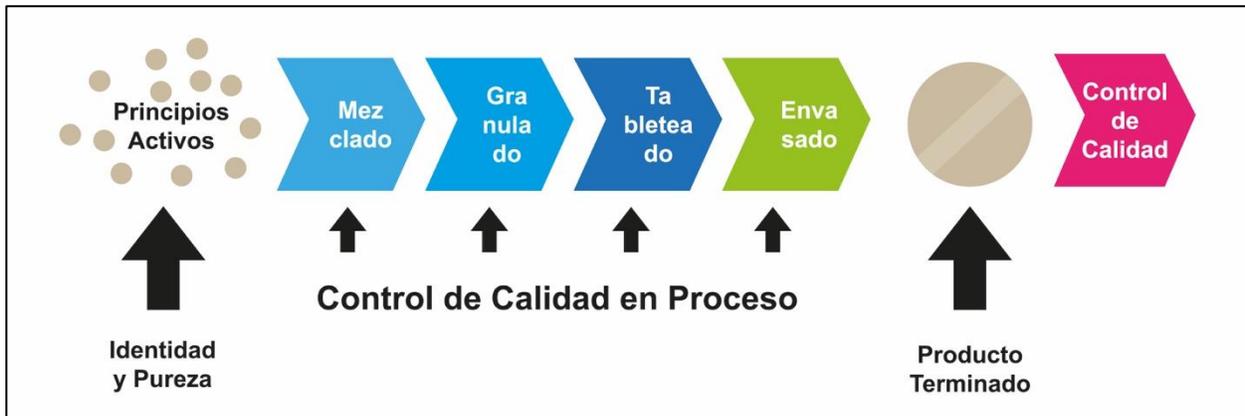


Figura 2. Control de proceso de fabricación de tableteado. Elaboración propia.

El proceso de tableteado puede dividirse en dos diferentes procesos: Compresión directa y granulación ya sea por vía húmeda o vía seca.

4.4.2.1.1 Compresión directa.

Es el proceso de fabricación donde se mezclan y comprimen los activos y excipientes, comprenden las etapas de pesada de materias primas, mezclado y compresión. Se caracteriza porque sus componentes tienen fluidez y compresibilidad.

4.4.2.1.2 Granulación vía seca.

Se basa en la mezcla, compactación, fragmentación, granulación. Se aplica cuando los componentes de la mezcla son sensibles a la humedad, no pueden resistir temperaturas elevadas de secado o no se cuenta con suficiente adhesión de las partículas.

4.4.2.1.3 Granulación vía húmeda.

Consiste en humectar la mezcla de polvos con una solución del aglutinante, proporcionando adherencia a los componentes de la formulación, obteniendo una masa húmeda que pase a través una malla para obtener un granulado húmedo, se seca en un horno y se tamiza para después mezclar con el lubricante y comprimirlo (ver Figura 3).

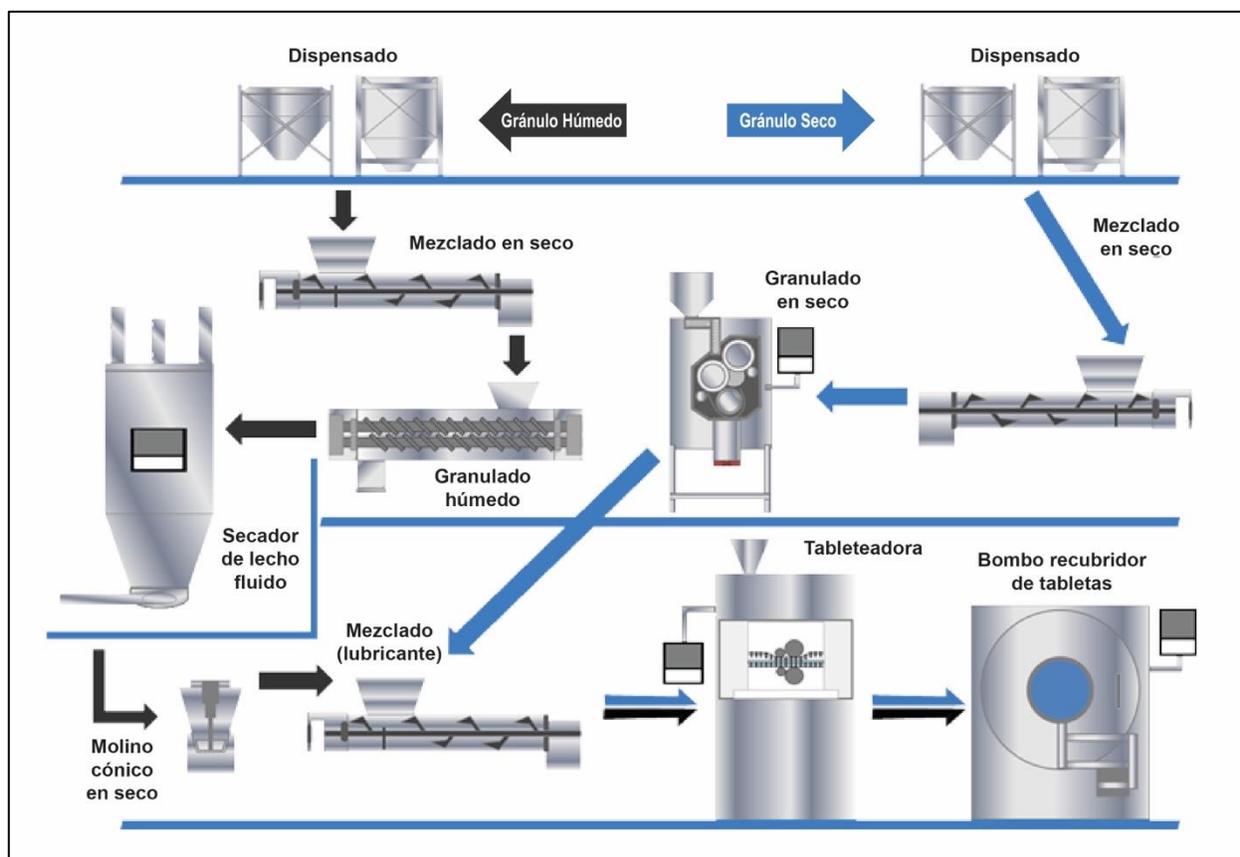


Figura 3. Proceso de granulación por vía húmeda y vía seca. Obtenido de www.pharmatips.in, traducción propia.

4.4.2.2 Cápsula.

Es un cuerpo hueco, obtenido por moldeo de gelatina, que puede ser textura dura o blanda, dentro de la cual se dosifica el o los fármacos y aditivos en forma sólida o líquida. Se fabrican por una técnica de inmersión y posteriormente y están constituidas por dos secciones que son puestas a disposición para la industria farmacéutica como cápsulas vacías cerradas. Luego en un proceso separado se vuelven a abrir y son llenadas de polvo o granulado, para finalmente ser cerradas definitivamente. Las cápsulas blandas están constituidas por una sola sección y son selladas después de su dosificación y posterior a ello no se pueden volver a abrir.

4.5 Preparación de análisis microbiológicos.

4.5.1 Esterilización del material.

Con el fin de garantizar que el material (ver Anexo 2) no sea una fuente de contaminación y con ello poder descartar falsos positivos fue sometido a esterilización por calor húmedo.

La esterilización es definida por la OMS como la técnica de saneamiento cuya finalidad es la destrucción de toda forma de vida, aniquilando todos los microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, incluidas sus formas esporuladas, altamente resistentes.

La técnica de esterilización empleada fue por calor húmedo, la cual emplea vapor saturado a presión y se lleva a cabo en una cámara llamada autoclave. El principio básico de operación consiste en que el aire en el interior de la cámara de esterilización es desplazado por el vapor saturado mediante el uso de válvulas de escape o trampas. Para desplazar el aire de la cámara y del interior de los artículos con mayor eficacia, el ciclo de esterilización puede incluir etapas de evacuación de aire y de vapor.

El diseño o elección de un ciclo para determinados productos o componentes depende de varios factores que incluyen la termolabilidad del material, conocimiento de la penetración del calor en los artículos y otros factores descritos en el programa de validación (temperatura, tiempo, presión, humedad, indicadores biológicos, calificación de instalaciones, calificación de operaciones). Aparte de esa descripción de los parámetros del ciclo de esterilización, usar una temperatura de 121 °C, se conoce como F0. El fundamento de la esterilización por calor húmedo es la desnaturalización y coagulación de proteínas.

4.5.1.1 *Proceso.*

El material por emplear para el análisis microbiológico se esteriliza por calor húmedo a una temperatura de 121 °C por 30 minutos. Generalmente se someten a esterilización frascos para dilución de 100 mL con caldo soya tripticaseína, reservorios de vidrio de 1 L (con Agar Soya Tripticaseína, Dextrosa Sabouraud, Agar Mac Conkey, Caldo Mac Conkey, Agar Base Cetrimida, Agar Sal Manitol, Caldo Dextosa Sabouraud, Caldo Rapaport Vassiliadis y Caldo Mossel), pipetas graduadas de vidrio de 10 mL, pinzas de precisión, espátulas, entre otros. Este material fue empleado en el análisis de límites microbianos. En cada ciclo de esterilización (previamente validado) se introducen viales de vidrio o de plástico de indicadores biológicos que contenían esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, los cuales, al término del ciclo de esterilización, son incubados de 55 a 60 °C por 48 h, para asegurar que el ciclo de esterilización haya sido exitoso.

4.5.1.2 *Interpretación.*

Transcurrido el tiempo de incubación, los resultados fueron interpretados conforme al cambio en la coloración; si los viales se tornan amarillos es por la alteración del pH de la solución que resulta de la actividad microbiana. La ampolla no debe mudar de color, pues lo esperado es que los microorganismos hayan sido destruidos en el proceso de esterilización en la autoclave, de haber cambio de coloración el ciclo se rechaza pues nos indica que hay crecimiento microbiano, en este caso se tendría que volver a correr el ciclo de esterilización con nuevos indicadores hasta que no ocurra un cambio de coloración ni

turbidez. Si el color es morado o marrón sin turbidez el ciclo es aprobado, pues indica que no hubo crecimiento microbiano, por lo que el ciclo de esterilización se considera como exitoso. En cada ciclo de esterilización se utilizaron controles positivos los cuales no se sometieron al ciclo de esterilización, sin embargo, fueron activados de la misma forma que los viales sometidos en cada ciclo de esterilización. La finalidad es probar tanto la viabilidad de las esporas como verificar si la incubadora está funcionando correctamente. A su vez se emplearon controles negativos los cuales no contienen esporas con el fin de observar cómo deben comportarse los viales que cumplan exitosamente el proceso de esterilización.

4.5.2 Preparación de medios de cultivo.

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos (ver preparación en Figura 4). La composición del medio dependerá de la especie que se quiera cultivar, porque las necesidades nutricionales varían considerablemente entre cada especie. Existen *medios generales*, que son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos; *medios de enriquecimiento*, que favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás; *medios selectivos*, que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás; y *medios diferenciales*, que ponen de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee. Hay microorganismos muy poco exigentes que no necesitan nutrientes ni condiciones especiales para crecer, pero también hay microorganismos muy exigentes que necesitan determinadas sustancias como vitaminas, suero o sangre o temperaturas para poder crecer.

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

4.5.2.1 Agar Soya Trypticaseína.

Medio de uso general que favorece el crecimiento de microorganismos exigentes y no exigentes incluidas las bacterias anaerobias y aerobias, aunque no es el medio de preferencia para estas.

4.5.2.2 Agar Dextrosa Sabouraud.

Medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos, en especial dermatofitos. Las peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados. La dextrosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos.

4.5.2.3 Caldo soya tripticaseína.

Es un medio líquido para enriquecimiento de uso general utilizado en procedimientos cualitativos para la prueba de esterilidad y para el enriquecimiento y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes en exceso. Puede utilizarse para la suspensión, el enriquecimiento y el cultivo de cepas aisladas en otros medios.

4.5.2.4 Agar Mac Conkey.

Medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos. Este medio es sólo ligeramente selectivo, dado que la concentración de sales biliares que inhiben los microorganismos Gram-positivos, es baja en comparación con otros medios en placa entéricos. Las peptonas proporcionan los nutrientes. El cristal violeta inhibe las bacterias Gram-positivas, en especial los enterococos y estafilococos. La diferenciación de los microorganismos entéricos se logra mediante la combinación de lactosa y el indicador de pH rojo neutro. Se producen colonias incoloras o de color de rosa a rojo según la capacidad del aislado para fermentar carbohidratos.

4.5.2.5 Agar Base Cetrimida.

Utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*. La peptona sirve como fuente de nitrógeno y el glicerol se utiliza como fuente de carbono y energía. La producción de piocianina se estimula mediante el cloruro de magnesio y el sulfato potásico en el medio. La cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) es un compuesto de amonio cuaternario que inhibe una amplia variedad de otros organismos, incluidos otras determinadas especies de *Pseudomonas* y organismos relacionados.

4.5.2.6 Agar Sal Manitol.

Se emplea en el aislamiento selectivo de estafilococos y para la detección de *Staphylococcus aureus*. Contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7,5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos. La fermentación de manitol, indicada por el cambio del indicador de rojo fenol, facilita la diferenciación de la especie de estafilococos. Los estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol.

4.5.2.7 Caldo Dextrosa Sabouraud.

Utilizado en el enriquecimiento y cultivo de hongos y levaduras. La peptona de caseína y la peptona de carne constituyen la fuente de nitrógeno, vitaminas y carbono suficientes para su crecimiento, la glucosa es su fuente de energía.

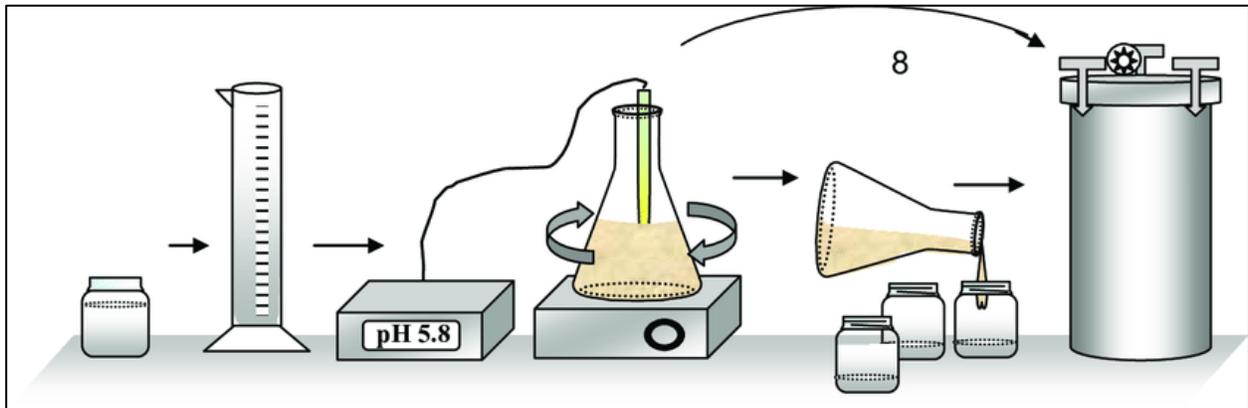


Figura 4. Diagrama de preparación de medios de cultivo. Clarkson, D. T. & Hanson, J. B. (1980).

4.5.3 Prueba de calidad de medios de cultivo.

El fundamento de la prueba de calidad de medios de cultivo consiste en establecer un procedimiento para valorar la ausencia o presencia de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos viables. Debe realizarse en condiciones asépticas para evitar la contaminación microbiana del material a emplear (ver Figura 5).

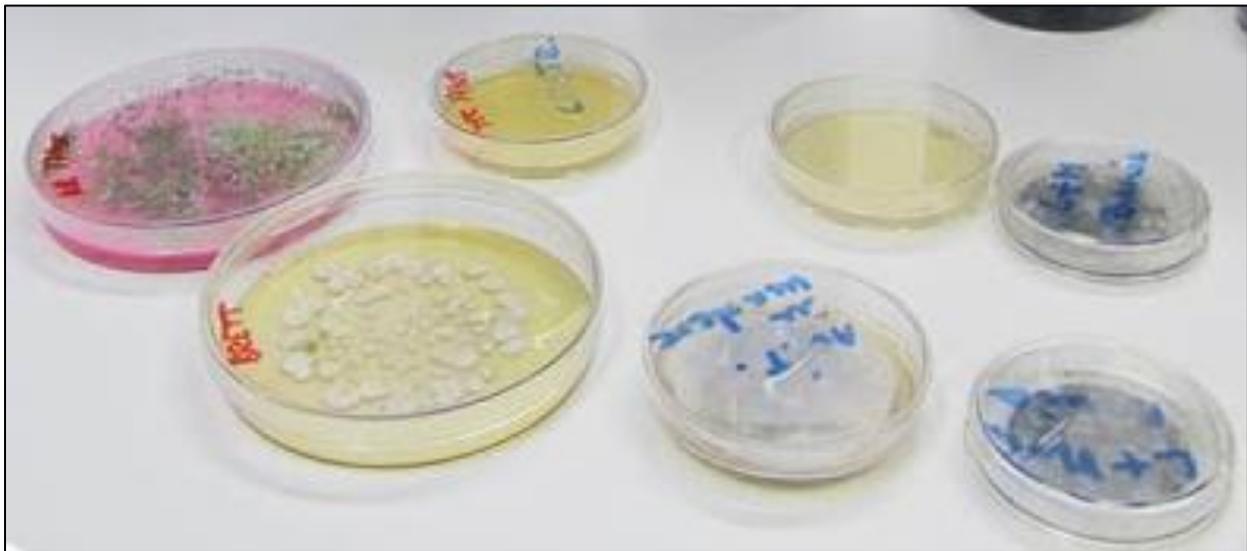


Figura 5. Prueba de calidad para medios de cultivo. Elaboración propia.

4.5.4 Promoción de crecimiento en medios de cultivo.

La prueba de promoción de crecimiento es empleada para los medios de cultivo ingresados para análisis con el fin de garantizar que permitir el desarrollo microbiano, aún en concentraciones bajas de los microorganismos. Para esta evaluación se deben utilizar al menos un microorganismo capaz de crecer, un microorganismo capaz de crecer en

medios selectivos y que presente características de diferenciación y otro microorganismo para el cual su crecimiento sea inhibido (ver Anexo 5, Figura 6). Los microorganismos empleados para la evaluación deben formar parte de la colección microbiana del laboratorio ATCC. La selección depende del medio de cultivo a evaluarse.

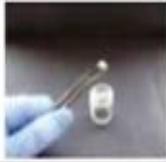
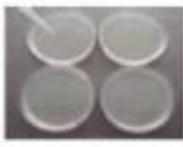
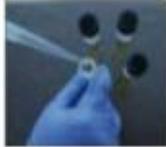
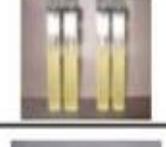
PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO		PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO	
	Paso 1 Preparar el inoculo.		Paso 1 Preparar el inoculo.
	Paso 2 Inocular las cajas preparadas del nuevo y del anterior lote por duplicado.		Paso 2 Inocular las cajas preparadas del nuevo y del anterior lote por duplicado.
	Paso 3 Realizar el extendido del inoculo e incubar.		Paso 3 Inocular un medio no selectivo.
	Paso 4 Hacer recuento del lote previamente aprobado.		Paso 4 Hacer recuento del lote previamente aprobado.
	Paso 5 Hacer recuento de colonias del lote nuevo.		Paso 5 Hacer la comparación visual de los dos lotes analizados.
	Paso 6 Comparar los resultados de los lotes. El recuento debe estar dentro del factor de 2.		Paso 6 Realizar el recuento en el medio no selectivo el cual debe ser menor a 100UFC.

Figura 6. Promoción de medios de cultivo. Elaboración propia.

4.5.5 Conservación de cepas microbianas.

Se deben mantener a los microorganismos de referencia mediante el sistema de lote semilla, de manera que los microorganismos no tengan más de 5 pases a partir de la cepa original. Las suspensiones de los microorganismos de referencia deben ser preparadas con solución amortiguadora de fosfatos con pH de 7.2 (ver Anexo 3). Estas suspensiones deben utilizarse dentro de un periodo de 2 a 24 h siempre y cuando sean almacenadas en refrigeración (2 a 8°C). En la Figura 7 se ilustra el proceso.

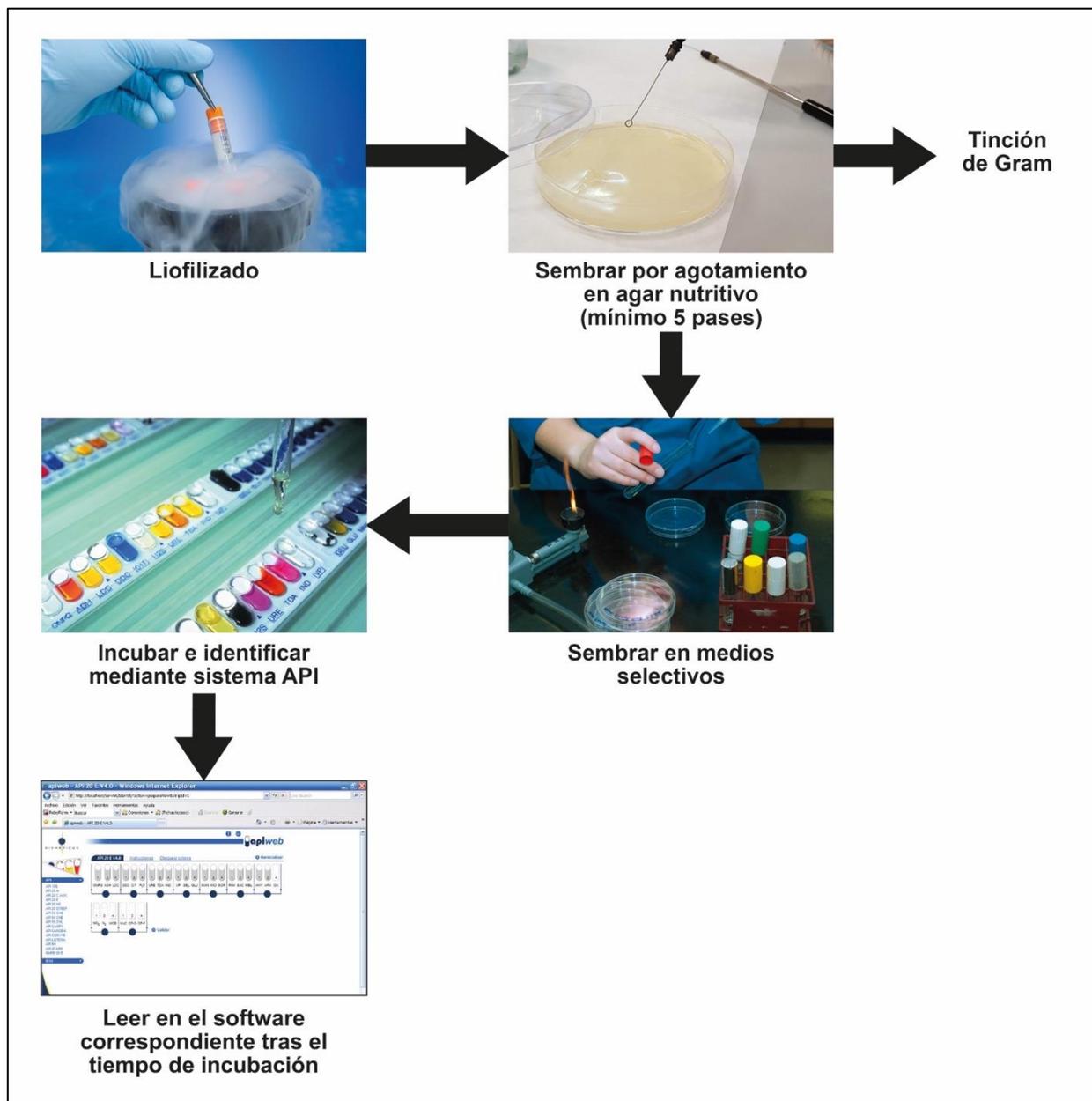


Figura 7. Conservación de medios de cultivo. Elaboración propia.

El análisis de límites microbianos se enfocó principalmente en las siguientes etapas de fabricación: insumos, producto intermedio, a granel y semiterminado. En ellos se buscaba encontrar o descartar la presencia de mesofílicos aerobios, microorganismos específicos (*E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi* y *C. albicans*), hongos filamentosos y levaduras. En caso de presentar desarrollo en alguna de las etapas anteriores, se procedió a la identificación del género y especie del microorganismo correspondiente con base en sus características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas; así como la identificación de la posible causa de contaminación, las veces que se había presentado y la repercusión en la salud.

- 5 -
METODOLOGÍA

Considerando los métodos básicos descritos en los antecedentes, en esta sección se describe la metodología empleada para el análisis microbiológico de sólidos no estériles cuyos resultados serán discutidos, desde la preparación de controles hasta la identificación de microorganismos específicos. Se utilizan diagramas (ver Figuras 8, 9, 10 y 11) para facilitar la comprensión de los procesos y abonar al espíritu didáctico del trabajo.

5.1 Controles.

La preparación de controles permite tener un marco de referencia que sirve para la interpretación de los resultados del análisis.

5.1.1 Preparación del inóculo

En general para cada microorganismo, realizar lo siguiente:

- a. Realizar resiembras a partir de los cultivos que se tienen almacenadas en tubo con agar soya tripticaseína (AST) inclinado.

- b. Tomar con ayuda de un asa estéril una porción del cultivo y transferir a un medio de cultivo fresco, para el caso de bacterias incubar de 18 a 24 h a una temperatura entre 30 a 35 °C, en el caso de hongos y levaduras incubar de 3 a 5 días a una temperatura de 20 a 25 °C.

5.1.2 Evaluación del inóculo

- a. Terminando el periodo de incubación, cosechar con asa bacteriológica estéril, colocar el inóculo en un tubo de ensayo que contenga 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2. Las suspensiones deben utilizarse dentro de un período 4 horas.

- b. De la suspensión obtenida, ajustar a una concentración del 80% de transmitancia a 580 nm o en su defecto utilizar escala de Mc Farland ajustando con el estándar de 0.5.

- c. Realizar diluciones decimales con 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, y sembrar por duplicado 1 mL de cada una de las diluciones en placa petri, agregar AST para bacterias y ADS para hongos y levaduras, homogeneizar completamente.

- d. Incubar las placas invertidas entre 30 °C y 35 °C durante 18 a 24 horas para bacterias, en caso de levaduras y hongos incubar de 20 a 25 °C durante 3 a 5 días.
- e. Realizar el recuento de las placas para establecer en qué dilución se encuentra el inóculo deseado (10 -100 UFC).

5.1.3 Controles negativos

Se utilizan para verificar las condiciones de la prueba. No debe presentar ningún crecimiento de microorganismos.

a. Control negativo de medios de cultivo:

- Vaciar de 15 a 20 mL en cajas petri por duplicado del medio de cultivo de AST y ADS previamente identificadas.
- Tomar 1 mL de CST y colocar en cajas petri, agregar medio de cultivo AST y ADS, dejar solidificar.
- Incubar las placas con AST de 30-35 °C durante 3 días y las placas de ADS incubar de 20-25 °C durante 5 días.

5.1.4 Controles positivos.

- Inocular con 1 mL de una suspensión de microorganismos que contenga 100-1000 UFC/mL de cada microorganismo a probar en frascos que contengan 100 mL de CST.
- Agitar y transferir 1 mL de la suspensión anterior (10-100 UFC/mL) a una caja de petri previamente identificada como: “control positivo”
- Realizar por duplicado
- Incubar y describir las características macroscópicas y microscópicas de cada uno de los microorganismos en los casos en los que se presentó crecimiento.
- Obtener un porcentaje de recuperación de factor 2 del 50 a 200%.
- Agregar AST para el caso de bacterias y ADS para el caso de hongos y/o levaduras según corresponda.
- Incubar las placas con AST de 30-35 °C durante no más de 3 días y las placas de ADS incubar de 20-25 °C durante no más de 5 días.
- Finalizando la incubación, obtener cuenta total y registrar.

5.1.4.1 Agar Dextrosa Sabouraud.

Para este control positivo se sembraron las siguientes especies:

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (no debe presentar crecimiento).

5.1.4.2 Agar Soya tripticaseína.

Para este control positivo se sembraron las siguientes especies:

- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Salmonella typhimurium* ATCC 9027
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

5.1.4.3 Caldo Soya tripticaseína.

Para este control positivo se sembraron las siguientes especies:

- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Salmonella typhimurium* ATCC 9027
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

5.1.5 Cálculo del porcentaje de recobro:

Cumpliendo el tiempo de incubación, realizar conteo de colonias. Posteriormente, debe calcularse el porcentaje de recobro con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{cuenta total promedio en producto}}{\text{cuenta total promedio de control positivo}} * 100$$

Tabla 2. Microorganismos utilizados en Limites Microbianos

MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO	TIEMPO DE INCUBACIÓN	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	MICROORGANISMO
ASM	18 a 48 h	30-35 °C	<i>Staphylococcus aureus</i>
ABC	18 a 48 h		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CRV	18 a 24 h		<i>Salmonella typhimurium</i>
XLD	18 a 72 h		
CST	18 a 24 h		TODOS
AST	≤ 3 días		TODOS
AMC	18 a 48 h		<i>Escherichia coli</i>
CMC	24 a 48 h	42-44 °C	
ADS	≤ 5 días	20-25 °C	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
ADS	≤ 5 días		<i>Candida albicans</i>

Fuente: Elaboración propia.

5.2 Metodología general para determinación de límites microbianos de sólidos no estériles. (Mesofílicos aerobios, hongos y levaduras).

En la Figura 8 se describe esquemáticamente el proceso específico para determinar los límites de mesófilos aeróbicos, hongos y levaduras en muestras farmacéuticas.

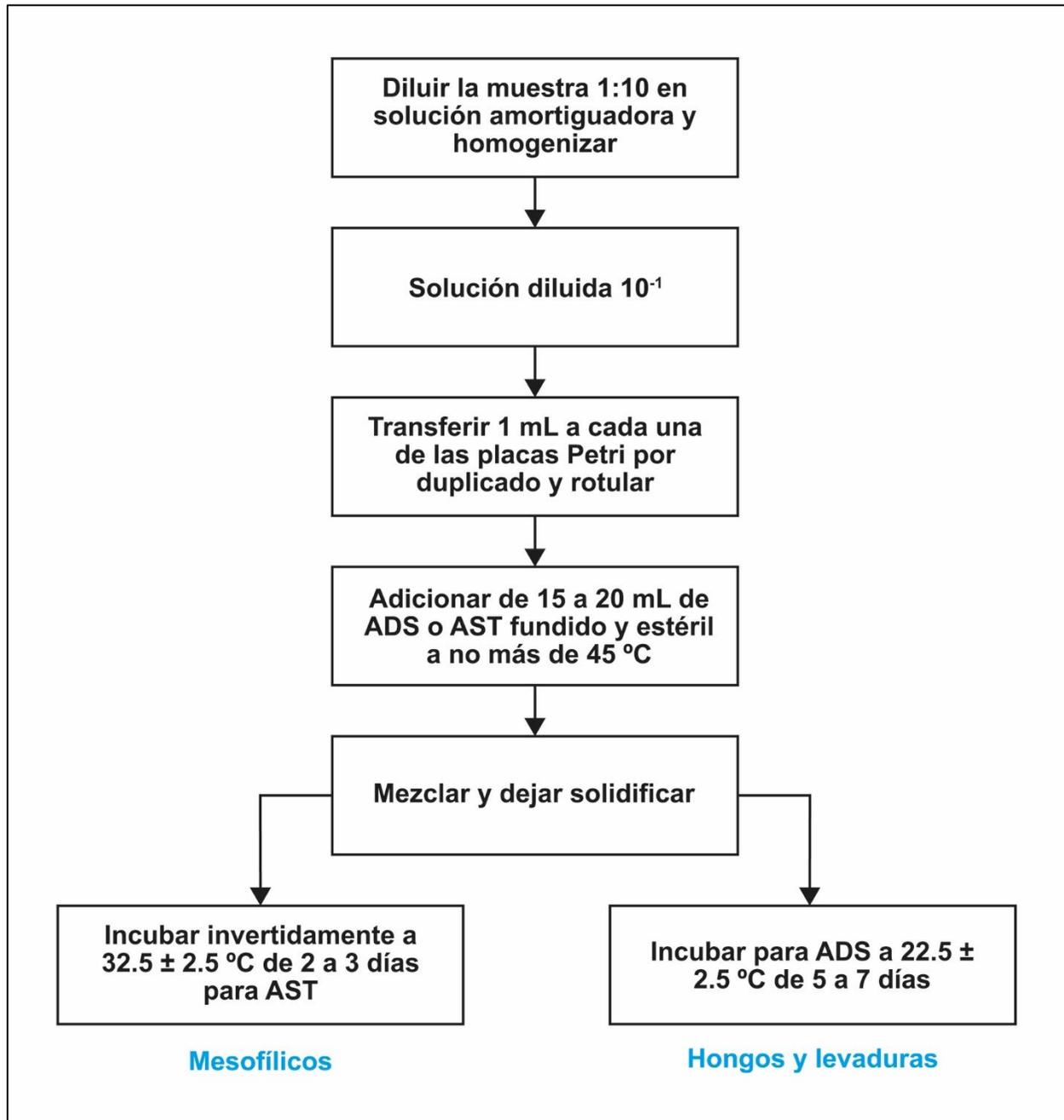


Figura 8. Procedimiento de determinación de límites microbianos de sólidos no estériles. (Mesofílicos aerobios, hongos y levaduras). Elaboración propia.

5.3 Determinación de Microorganismos Específicos

Estas pruebas permiten investigar la presencia de microorganismos específicos y determinar si una sustancia o preparado farmacéutico cumple con las especificaciones microbiológicas establecida.

5.3.1 Búsqueda de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

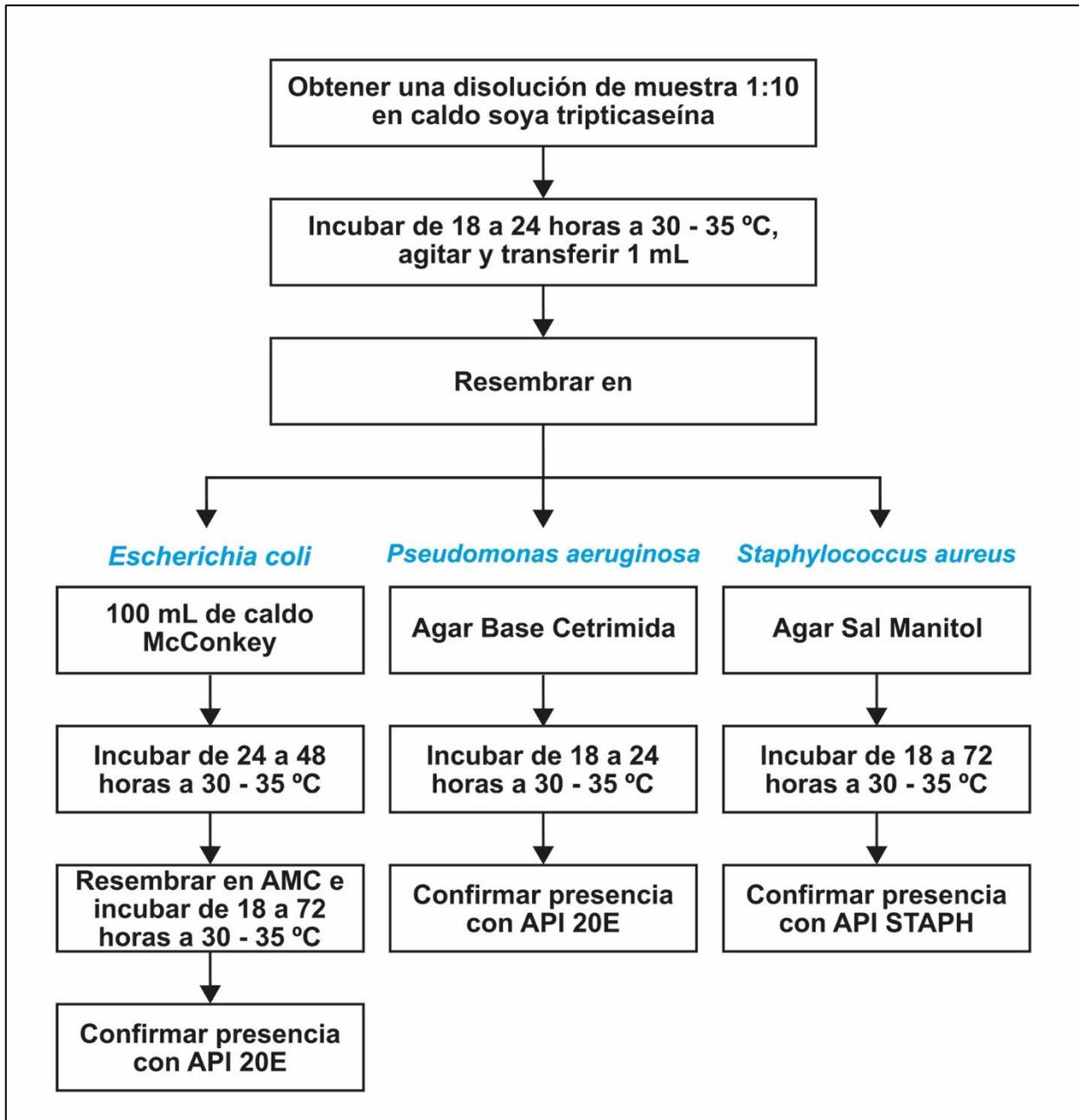


Figura 9. Procedimiento de búsqueda de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Elaboración propia.

5.3.2 Búsqueda de *C. albicans*.

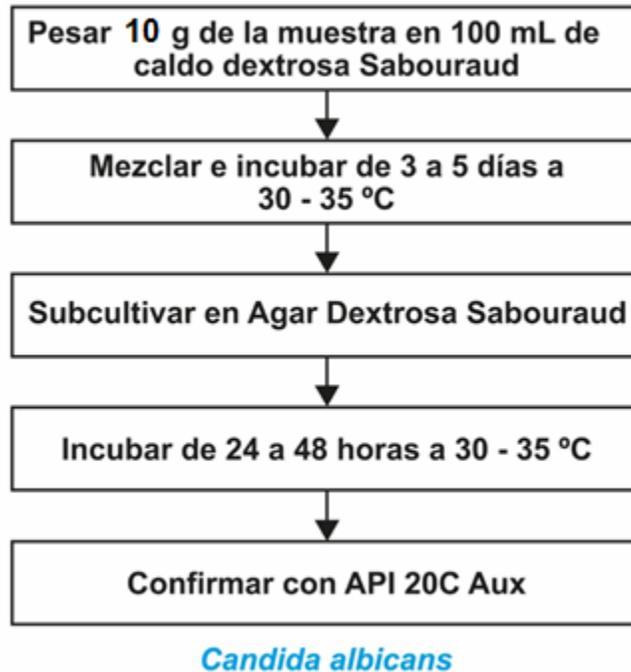
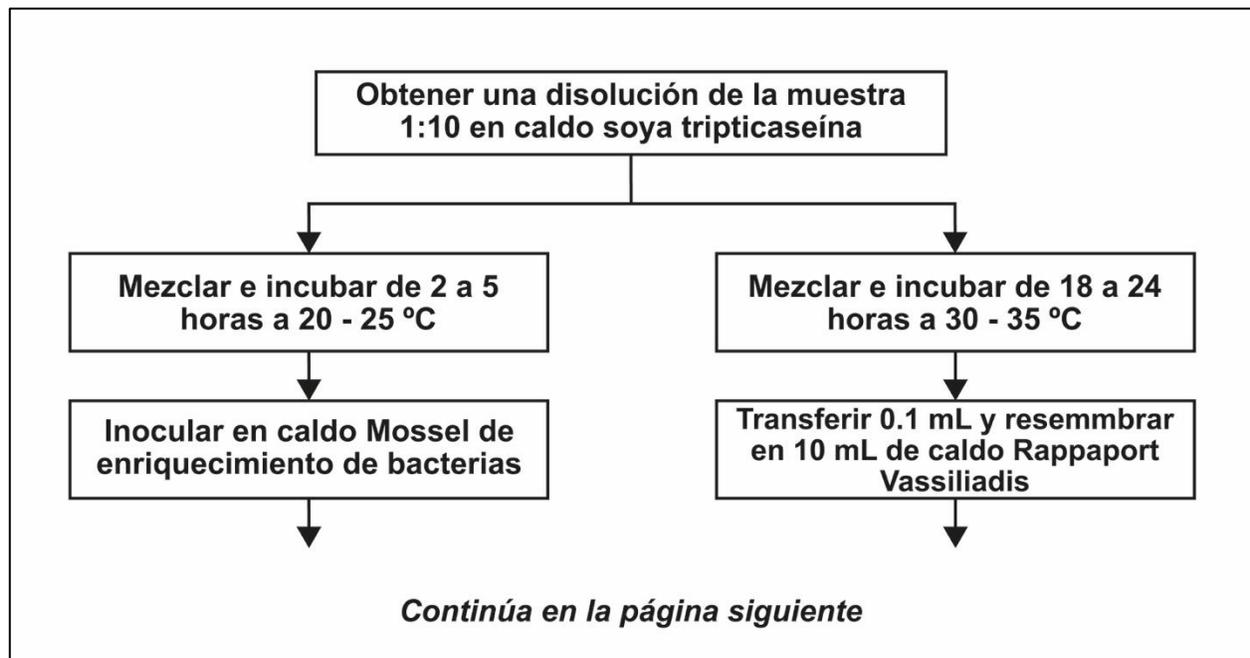


Figura 10. Procedimiento de búsqueda de *C. albicans*. Elaboración propia.

5.3.3 Búsqueda de *Salmonella sp* y bacterias Gram-Negativas bilis tolerantes.



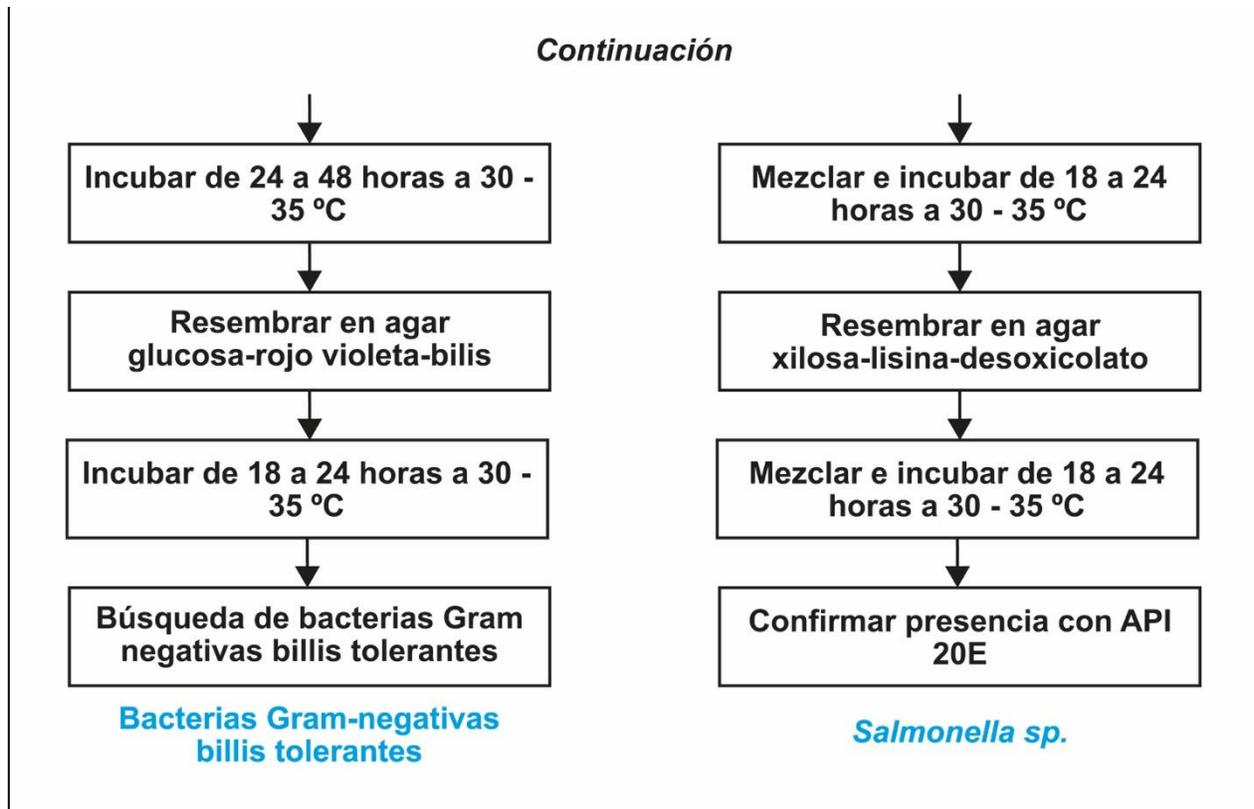


Figura 11. Procedimiento de búsqueda de *Salmonella sp.* y bacterias Gram-Negativas bilis tolerantes. Elaboración propia.

En cada una de las determinaciones se debe emplear un control negativo el cual no debe presentar crecimiento al incubarse bajo las mismas condiciones que la muestra y un control positivo el cual debe ser inoculado con una suspensión estandarizada de no más de 100 UFC/mL de cada uno de los microorganismos de prueba, e incubar en las mismas condiciones de la muestra, el crecimiento debe cumplir con las características microscópicas y macroscópicas de cada uno de los microorganismos que se emplearon.

5.4 Muestras de origen vegetal.

Las muestras de origen vegetal son más propensas a un acarreo microbiano ya que por su contenido de nutrientes favorecen el crecimiento de diversos microorganismos. Por ello es necesario realizar varias diluciones para que en caso de presentarse crecimiento microbiano se favorezca el conteo e identificación de dicho crecimiento.

- 6 -
RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los análisis de límites microbiológicos realizados a formas farmacéuticas sólidas no estériles en sus diferentes etapas de fabricación durante septiembre del 2013 a diciembre del 2015 (Tabla 3). Dependiendo de la naturaleza de los fármacos se dividieron en cuatro tipos de productos como son: productos no controlado (medicamentos de venta libre); productos controlados (medicamentos que actúan sobre el sistema nervioso central y de venta controlada); productos hormonales (medicamentos que contienen hormonas que ayudan a reemplazar o a mejorar alguna función dentro del organismo) y productos de maquilas (medicamentos de otras empresas que llegan en su etapa intermedia para continuar con su fabricación hasta la etapa de producto terminado).

Tabla 3.
Concentrado de las muestras analizadas durante el 2013, 2014 y 2015, en sus diferentes etapas de fabricación.

Tipo de Producto	Periodo	Número de muestras				
		Insumos	Intermedio	Granel	Semiterminado	Total
No Controlado	2013	123	340	612	690	1765
Controlado	2013	60	60	102	113	335
Hormonales	2013	2	18	27	33	80
Maquilas	2013	N/A	939	2004	2037	4980
Total	2013	185	1357	2745	2873	7160
No Controlado	2014	132	960	1720	1900	4712
Controlado	2014	50	180	396	423	1049
Hormonales	2014	2	60	132	155	349
Maquilas	2014	N/A	1021	2184	2402	5607
Total	2014	184	2221	4432	4880	11717
No Controlado	2015	129	845	1563	1820	4357
Controlado	2015	30	395	810	902	2137
Hormonales	2015	1	74	201	227	503
Maquilas	2015	N/A	1108	2277	3002	6387
Total	2015	160	2422	4851	5951	13384
Totales		529	6000	12028	13704	32261

Fuente: Elaboración propia.

Se puede observar que existió un incremento de muestras analizadas microbiológicamente en las diferentes etapas de fabricación conforme el paso de los años por la incorporación de nuevos productos como puede apreciarse en la Figura 12.

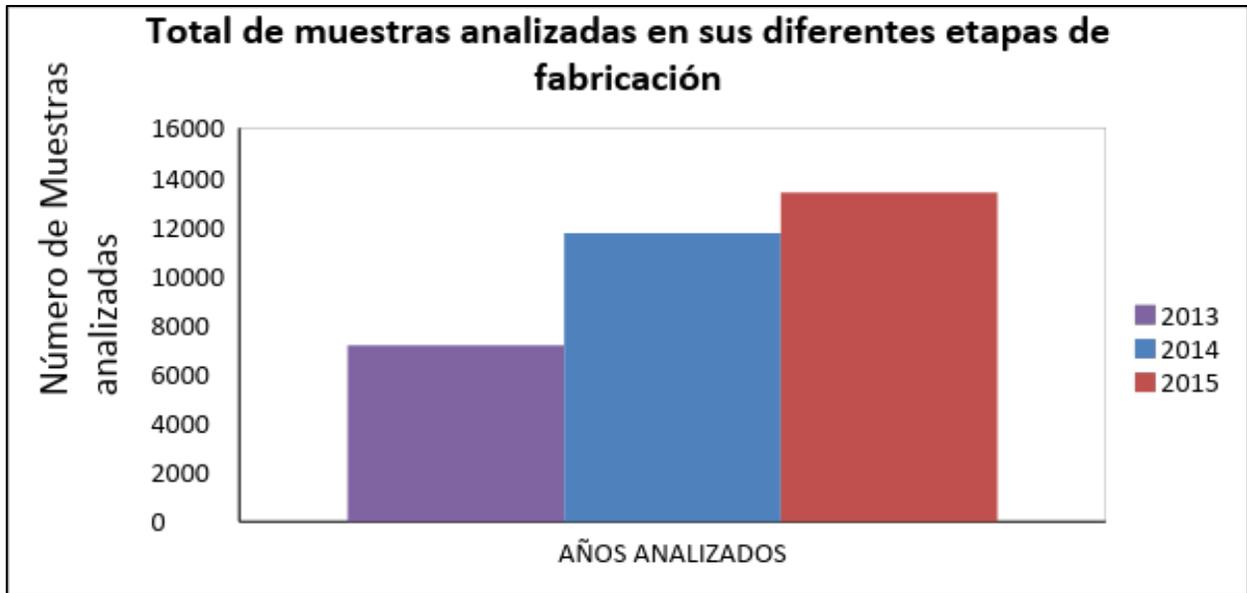


Figura 12. Tendencia de muestras analizadas en sus diferentes etapas de fabricación durante el 2013, 2014 y 2015. Elaboración propia.

La siguiente tabla indica los microorganismos que se encontraron durante los análisis realizados en el periodo de septiembre del 2013 a diciembre del 2015.

Tabla 4.

Microorganismos encontrados en análisis 2013 - 2015.

Mes	Muestras con carga microbiana		
	2013	2014	2015
Enero	N/A	1	0
Febrero	N/A	0	2
Marzo	N/A	0	0
Abril	N/A	0	1
Mayo	N/A	2	0
Junio	N/A	0	0
Julio	N/A	2	1
Agosto	N/A	0	0
Septiembre	0	0	0
Octubre	1	0	0
Noviembre	2	0	0
Diciembre	0	3	2

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 13 se puede observar que durante el año 2014 hubo más incidencia en el crecimiento microbiano en comparación a los años 2013 y 2015; esto pudo deberse a que en ese año incremento el número de muestras de productos no controlados, por lo que la probabilidad de encontrar muestras con carga microbiana aumento en comparación a los otros dos años, además de que por aumento en la carga de trabajo pudo ocurrir algún error asociado al proceso de fabricación, como puede ser una limpieza inadecuada, lo cual de alguna forma favoreció la contaminación del producto. Sin embargo, los microorganismos encontrados no son específicos y no representan un riesgo para la salud del consumidor.

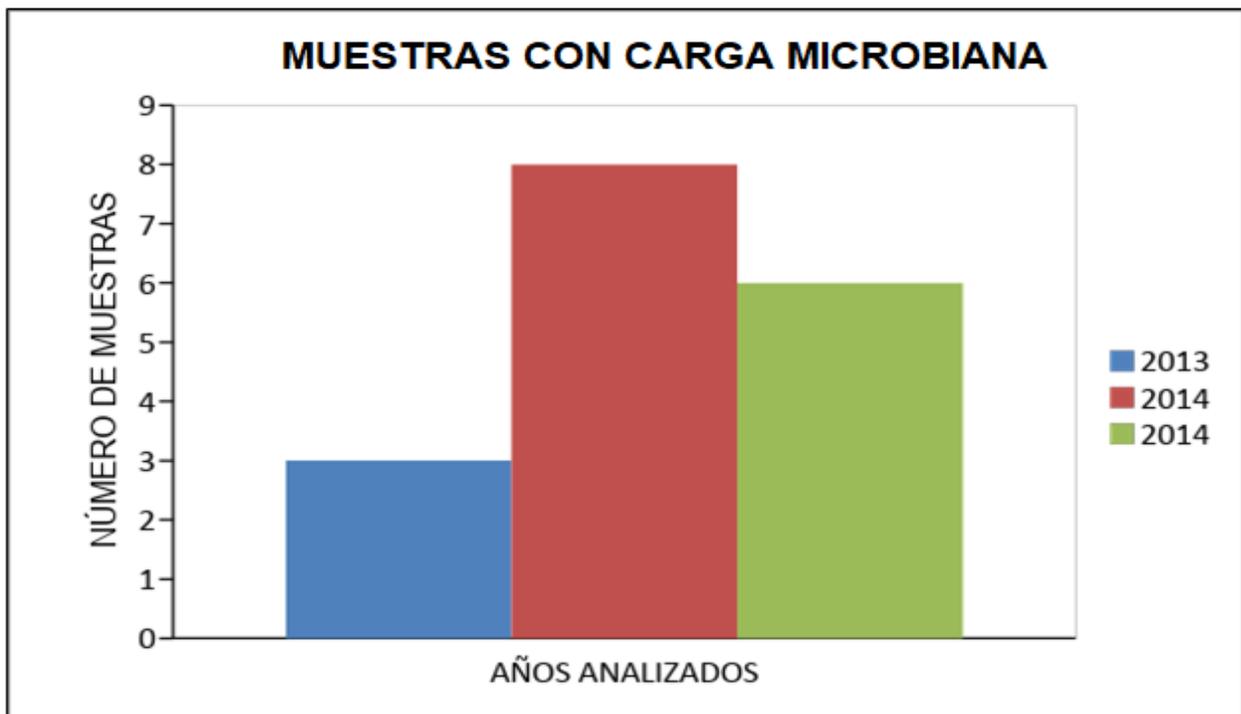


Figura 13. Total de muestras con carga microbiana identificadas por año. Elaboración propia.

Las especies encontradas en las muestras con carga microbiana durante el periodo fueron:

Micrococcus sp. Es un microorganismo que se encuentra en ambientes diversos, incluyendo agua y suelo. Son bacterias Gram-positivas y típicamente aparecen en tétradas.

Ochrobactrum anthropi. Es un bacilo Gram-negativo, no fermentador, que se relaciona con infecciones en pacientes inmunocomprometidos o personas debilitadas con dispositivos sintéticos implantados.

Staphylococcus epidermidis: Son cocos Gram-positivos arreglados en grupos. Son coagulasa-negativa, termonucleasa-negativo aunque a veces varía, y se presentan frecuentemente en la piel de humanos, de animales y en membranas mucosas.

Bacillus sp. Es una bacteria Gram-positiva, Catalasa-positiva, aerobia, comúnmente encontrada en el suelo. Tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiéndole tolerar condiciones ambientalmente extremas.

Streptococcus salivarius. Es un coco Gram-positivo que coloniza principalmente en la boca y la zona respiratoria superior de seres humanos algunas horas después del nacimiento, por tanto, la exposición adicional a estas bacterias es inofensiva. Se consideran un patógeno oportunista, encontrando raramente en la circulación sanguínea, donde ha estado implicada en casos de septicemia en personas con neutropenia.

Propionibacterium acnés. Es un bacilo Gram-positivo, de crecimiento relativamente lento, no esporulado y anaerobio estricto. Se halla en la biota normal de la piel y es catalogado como actor secundario en la infección dérmica. Está vinculado al acné, puede causar blefaritis crónica y es el principal causante de endoftalmitis postquirúrgicas crónicas. La bacteria es en gran parte comensal y está presente en la piel de la mayoría de las personas alimentándose de los ácidos grasos del sebo secretado por los poros desde las glándulas sebáceas. También puede encontrarse en todo el aparato digestivo del ser humano y de muchos otros animales.

– 7 –

DISCUSIÓN

Se clasificaron las muestras ingresadas para el análisis de límites microbianos de acuerdo con su etapa de fabricación y tipo de producto, con el fin de identificar si influían o no en la probabilidad de presentar una contaminación microbiana, ya sea por la naturaleza del proceso de fabricación, instalaciones y/o personal.

Dentro de las etapas de fabricación analizadas encontramos a los insumos, los cuales son surtidos por un proveedor externo para poder arrancar el proceso de fabricación (materias primas, frascos, tapas, PVC y aluminio) ; producto intermedio que es la etapa donde se mezclan los excipientes con los principios activos; producto a granel que es cuando los productos intermedios conocidos comúnmente como mezcla son sometido a los procesos de tableteo, compresión o encapsulado; y producto semiterminado que es la etapa en la cual el producto a granel es sometido a un envasado o a un blisteado, conocido generalmente como envase primario, para finalmente ser colocado en su envase secundario y con ello ser distribuido al cliente. Para cada una de las etapas de fabricación se aplicó la metodología de límites microbianos, la cual fue viable para cada una de las etapas.

El método de análisis de límites microbianos empleado se desarrolló a lo especificado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11ª Edición, para ello previamente se realizó una validación del proceso donde se comprueba la aptitud del método con el fin de demostrar su capacidad para poner en evidencia a los microorganismos presentes en una sustancia o producto farmacéutico y con ello asegurar que la cantidad de muestra y de volumen de dilución no afectará el crecimiento de los microorganismos y a su vez evitar los falsos negativos. Esta validación fue previamente retada con cada uno de los productos que se manejan en la empresa, a diferentes concentraciones y con distintos analistas, cumpliendo con las características de robustez, reproducibilidad, repetibilidad, exactitud, precisión, especificidad y linealidad, lo cual corroboró que dicho método de análisis es aplicable para todas las formas farmacéuticas sólidas no estériles fabricadas en la empresa.

Dentro del análisis de límites microbianos a productos sólidos no estériles se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- La esterilización del material a emplear y los medios de cultivo debía ser exitosa, ya que en caso de que no se ejecutara de la manera correcta podía arrojar resultados no confiables. En este análisis se utilizó el método de esterilización por calor húmedo (Autoclave), el cual contaba con ciertas condiciones de temperatura, presión y tiempo dependiendo de que se deseaba someter al proceso de esterilización. Para corroborar que el proceso de esterilización fuera exitoso se emplearon indicadores biológicos de *Geobacillus stearothermophilus*, debido a su capacidad de producir esporas, resistir presiones y temperaturas elevadas por tiempos prolongados. Para cada ciclo de esterilización se emplearon controles tanto positivos como negativos de los indicadores biológicos; los controles negativos eran viales que no contenían esporas, los controles positivos eran indicadores con esporas que no fueron sometidos al proceso de esterilización. Una vez concluido el proceso de esterilización los indicadores biológicos eran incubados por 48 horas a una temperatura de 55 a 60 °C, si al término del periodo de incubación se presentaba una coloración amarilla del indicador el proceso no se consideraba exitoso; en caso de que el indicador presentara coloración púrpura o marrón se consideraba el proceso de esterilización exitoso. Cabe mencionar que el autoclave previamente es sometido a una calificación y una validación.
- Manipular las muestras a analizar dentro de una campana de bioseguridad Clase II A, para tener condiciones asépticas y evitar una contaminación, al mismo tiempo de proteger al analista de cualquier contaminación química o microbiológica. Dicha campana era limpiada y sanitizada antes y después de su uso, corroborando dicha operación con ayuda de la exposición de placas de AST y ADS durante todo el análisis. Dichas placas eran incubadas al término del análisis en condiciones

específicas de tiempo y temperatura (ADS de 20 a 25 °C de 5 a 7 días y AST de 30 a 35 °C de 3 a 5 días) y con ello se aseguraba que la manipulación, sanitización y limpieza eran las adecuadas.

- El analista debía portar equipo de protección personal durante todo el análisis que constaba de un tyvek, cofia, guantes estériles, cubrebocas y zapatones, con el fin de evitar que interviniera como fuente de contaminación.
- Asegurar que nuestro medio de cultivo contará con los nutrientes y condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos de interés, para ello se realizaba semanalmente una promoción de los medios de cultivo que se iban a utilizar. Dicha promoción debía cumplir un porcentaje de recuperación de factor dos. Por ejemplo, para un medio de cultivo que se inoculaba con una solución de una concentración de 100 UFC/mL se esperaba recuperar mínimo 50 UFC y máximo 200 UFC, todas las colonias tenían que ser iguales y debían cumplir con las características microscópicas y morfológicas del microorganismo empleado. En caso de cumplir con cada una de las condiciones anteriores se podía concluir que nuestro medio de cultivo favorecería el crecimiento del microorganismo de interés y con ello asegurar la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Para la prueba de promoción de medio de cultivo se emplearon los siguientes microorganismos: *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Cada uno de ellos fue previamente estandarizado a una concentración conocida para poder determinar el porcentaje de recobro. Aunado a ello se empleaban controles negativos con el fin de asegurar que nuestro medio no se hubiera contaminado en algún proceso y en algunos casos se inoculaban microorganismos que no requirieran ninguno de los nutrientes propios del medio para crecer y así poder descartar falsos positivos y en su caso la selectividad de cada uno de los medios de cultivo.

A pesar de las consideraciones tomadas anteriormente se encontraron muestras que presentaban crecimiento microbiano. Sin embargo, la FEUM en su 11° Edición tiene establecidos ciertos criterios de aceptación para sólidos no estériles, por lo que es permisible que las muestras presenten cierto crecimiento⁷, siempre y cuando no se trate de microorganismos específicos (*S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*).

La cantidad de muestras analizadas que presentaban contaminación fue mínima en comparación del número de muestras ingresadas para análisis de límites microbianos al laboratorio de microbiología, y aunque la mayoría del crecimiento se debía a la naturaleza propia de la muestra porque su proceso de síntesis era a partir de plantas o huesos

acarreaba microbiota normal, se buscó corroborar que la contaminación no fuera por un descuido del personal y/o instalaciones (muestreo o manipulación inadecuada, un área de fabricación o de análisis contaminada o un equipo o material de muestreo sucio), y poder con ello identificar la causa raíz. Para ello se procedía a realizar una resiembra de la muestra en los agares selectivos de microorganismos específicos; previamente la muestra era enriquecida en Caldo soya tripticaseína (incubada de 30 a 35 °C por 18 a 24 h). En caso de presentar crecimiento en el agar soya tripticaseína y no presentar crecimiento en los medios selectivos, se procedía al aislamiento de la colonia, observando sus características microscópicas y macroscópicas, para finalmente hacer su identificación por medio de pruebas bioquímicas contenidas en un sistema de identificación denominado API® (ver Anexo 4), esto nos permitía saber a qué tipo de microorganismo era, las posibles causas de su presencia en las muestras y el impacto que pudiera ocasionar en la salud.

En caso de instalaciones y procesos se emplearon controles positivos y negativos los cuales se buscaba no arrojaran un resultado diferente a lo esperado y que el monitoreo ambiental del área de análisis no presentara contaminación; se monitoreaban las áreas de fabricación y equipos con los que la muestra tenía contacto directo, así como el monitoreo de uniforme y manos del personal de inspección y los operadores involucrados en el proceso; a su vez se supervisó que la toma de muestra se realizará bajo las condiciones de limpieza adecuada de manos y uniforme, aseo personal, manejo adecuado de guantes y bolsas estériles.

Si una vez que se realizaban las acciones anteriores de forma correcta, se reanalizaba la muestra, esta siguiera presentando crecimiento y estuviera fuera de especificaciones, se procedía a su rechazo.

Dependiendo de la etapa de fabricación del producto se tomaban las medidas pertinentes; si la muestra era materia prima o material de empaque se regresaba al fabricante y/o proveedor, si la muestra ya se encontraba en alguna etapa de fabricación se procedía a rechazar el lote y proceder a su destrucción.

– 8 –

CONCLUSIONES

Se garantizó la calidad del análisis microbiológico de formas farmacéuticas sólidas no estériles en la industria farmacéutica corroborando la correcta manipulación de la muestra con ayuda de los controles positivos y negativos, reduciendo costos, tiempo analista e impacto ambiental, gracias a la previa validación del proceso de análisis microbiológico de muestras, conocida como Límites Microbianos. Los resultados obtenidos demostraron que el analista era capaz de ejecutar el proceso de manera adecuada, además de reducir

la posibilidad de contribuir como una fuente de contaminación externa a la muestra. Con ello se pudo comprobar que los controles establecidos fueron adecuados para asegurar la calidad del producto y poder brindar a nuestros clientes resultados confiables y seguros.

Mediante la ayuda de tablas y gráficas se logró cuantificar las muestras que son ingresadas en el laboratorio de microbiología para su análisis durante un periodo mayor a dos años, con el fin de asegurar que se cuenta con una metodología aplicable a cualquier forma farmacéutica sólida no estéril y con ello proporcionar confiabilidad y seguridad para su consumo.

En base a todos los resultados obtenidos se logró asegurar que el método de análisis es aplicable para todas las formas farmacéuticas sólidas no estériles, que a su vez ayudan a reducir residuos, tiempos y costos. Además de que con ayuda de los controles empleados se asegura la calidad del análisis, brindando seguridad y confianza para que el producto pueda ser empleado para consumo humano.

Se evaluó que la calidad microbiológica de los productos farmacéuticos, obteniéndose una baja incidencia de muestras contaminadas, en caso de presentarse alguna contaminación se debía a la naturaleza propia de la muestra y no a un descuido del personal y/o instalaciones (muestreo o manipulación inadecuada, un área de fabricación o de análisis contaminada o un equipo o material de muestreo sucio). Se establecieron controles para garantizar la calidad del análisis microbiológico y con ello evaluar la habilidad del analista para manipular y ejecutar el proceso de una forma adecuada.

Se corroboró que el método de análisis microbiológico empleado es aplicable para todas las formas farmacéuticas no estériles, ya que cada uno de los productos analizados no presentaron ningún inconveniente al momento de ser analizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agis Ocaña Josue Gabriel, E. R. (s.f.). Control de calidad microbiológico en el laboratorio de análisis clínico. Obtenido de blogspot.com: <http://controlcmicrobiologia5203c.blogspot.com/p/pruebas-de-promocion-de-crecimiento-de.html>
2. apiweb. (s.f.). Obtenido de <https://apiweb.biomerieux.com>: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>
3. Bomblies, L. W. (Pharmeuropa Scientific notes 2007-1, 1-7.). Examination f Microbiological Quality of Pharmaceutical Raw Materials.
4. Carranza, E. K. (2013). Facultad de estudios superiores Zaragoza, UNAM. Obtenido de Manual electrónico de control de calidad en medios: https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_castillo_carranza.pdf
5. Clontz, L. (2008). Microbial limit and bioburden test: Validation Approaches and Global Requirements, 2ª Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2ª Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group.
6. D. en C. Gabriela Nájera Sánchez, Q. C. (s.f.). Laboratorio de Especialidades Inmunologicas S.A. de C.V. Obtenido de <https://www.lei.mx/2019/03/28/microbiologia-farmacutica/>
7. De Castro Norma, D. C. (2001). Morfología y estructura de los microorganismos. Obtenido de www.ucv.ve: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Control_Microbiol%C3%B3gico_PNE.pdf
8. Devivo, L. R. (Octubre de 2001). Campanas de flujo laminar y gabinetes de seguridad biológica. Obtenido de <http://www.ucv.ve>: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Campanas_de_flujo_laminar.pdf
9. Farmacologia comprimidos. (2014). Obtenido de slideshare: <https://es.slideshare.net/mildredlee/farmacologa-comprimidos>
10. Gamboa, S. G. (2001). Trabajo Practico Preparación de medios de cultivo. Obtenido de [/www.ucv.ve](http://www.ucv.ve): http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf

11. Garcia, C. (2012). Generalidades formas farmaceuticas. Obtenido de es.slideshare.net: <https://es.slideshare.net/garciaj.cesar/generalidades-formas-farmaceuticas>
12. Guia de adecuadas de manufactura para cuertos limpios (1989) . En Monografía Técnica N. 1. México D.F.: CIPAM. Obtenido de MICROBIOLOGIA FARMACEUTICA, MANUAL DE MICROBIOLOGÍA: <https://es.slideshare.net/BETTYGLORIA3/manual-cc-y-bioseguridad>
13. Identificación Microbiana. (s.f.). Obtenido de <http://www.ucv.ve>: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identificaci%C3%B3n.pdf
14. Koburger, M. E. (1984). Yeasts and Molds. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. USA.: 2nd ed. Marvin S. (Ed.).
15. Mahon, C. a. (2000). En C. a. Mahon, Textbook of Diagnostic Microbiolgy. USA: W.B. Saunders Company, Second Edition.
16. Manual de Practicas. (2012). Obtenido de slideshare: <https://es.slideshare.net/ESLAMA356/manual-de-practicas-2012>
17. Medios de Cultivo. (2013). Obtenido de es.slideshare.net: <https://es.slideshare.net/arlethnohelia/medios-de-cultivo-29095759>
18. Parker, B. T. (1999). Biología de los microorganismos. 8ª Edición. Prentice Hall Internationa.
19. Prescott, L., Harley, J., & Klein. (1999). Microbiología. cuarta edicion: McGraw-Hill Interamericana.
20. Recuento de Mesofilos aerobios. (23 de noviembre de 2015). Obtenido de <http://med.se-todo.com/biolog/4225/index.html>
21. SECRETARIA DE GOBERNACIÓN. (12 de diciembre de 1995). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
22. Secretaria de Gobernacion. (22 de julio del 2013). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Obtenido de Diario Oficial de la Federacion: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5307536&fecha=22/07/2013

23. Secretaria de Gobernacion. (04 de febrero de 2016). Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de fármacos. Obtenido de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424377&fecha=04/02/2016
24. Secretaria de salud. (2014). FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 12ª EDICION. CIUDAD DE MÉXICO: PUBLICACIONES E IMPRESIONES DE CALIDAD S.A. DE C.V. pág. 464-473
25. Smoot, P. M. (09 de ENERO de 2001). En Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. USA. 71-87. Obtenido de depa.fquim.unam.mx: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores_6422.pdf
26. Solcaps. (s.f.). Obtenido de <http://solchem.es/pdf/pdf-productos/Solcaps-ESP.pdf>
27. Soto, R. (s.f). Analisis microbiologico de productos no esteriles: pruebas para microorganismos especificos. Obtenido de <https://www.academia.edu>: https://www.academia.edu/5171881/AN%C3%81LISIS_MICROBIOL%C3%93GICO_DE_PRODUCTOS_NO_EST%C3%89RILES_PRUEBAS_PARA_MICROORGANISMOS_ESPEC%C3%8DFICOS
28. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. (2019). FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA 42 NF 37. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. pág. 6468-6476, 7955-7993.
29. Tortora G. J., B. R. (2007). . En B. R. Tortora G. J., Introducción a la Microbiología (págs. 613-808). México: Editorial Médica Panamericana 9a Edición.
30. Yin, J. C. (2014). El papel de la caracterizacion del polvo en la manufactura continua. Pharmaceutical Technology. Obtenido de http://www.pharmatechespanol.com.mx/articulo/1142.el_papel_de_la_caracterizacion_del_polvo_en_la_manufactura_continua
31. Pérez Zazueta Giselle, 2013, ProMéxico, La Industria Farmaceutica en México, página 12, Secretaria de economia. Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62881/130820_DS_Farmaceutica_ESP.pdf

— ANEXO 1 —
ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

A1.01

ADS.

Agar Dextrosa Sabouraud.

A1.02

Área aséptica.

Área diseñada, construida y mantenida con el objeto de tener dentro de límites preestablecidos el número de partículas viables y no viables en superficies y medio ambiente.

A1.03

AST.

Agar Soya tripticaseína.

A1.04

Certificado de análisis.

Es el resumen de los resultados obtenidos de las determinaciones efectuadas a muestras de materias primas, materiales u otros insumos, producto intermedio y producto terminado, las referencias de los métodos de análisis o de prueba utilizados y la determinación del cumplimiento a especificaciones previamente establecidas, avalado por la persona autorizada.

A1.05

Contaminación.

Presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables.

A1.06

Contaminación cruzada.

Presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables, procedentes de otros procesos de fabricación.

A1.07

Envase primario.

Es un elemento que contiene el fármaco o preparado farmacéutico y que está en contacto directo con él.

A1.08

Insumos.

Todas aquellas materias primas, material de empaque primario, material de acondicionamiento y productos que se reciben en una planta.

A1.09

Material de empaque primario.

Es todo aquel que contiene al producto en su presentación individual o básica dispuesto para la venta de primera mano.

A1.10

Muestra.

Cantidad de material cuya composición es representativa del lote que va a ser examinado.

A1.11

Polvo.

Forma sólida que contiene el o los fármacos y aditivos, finamente molidos y mezclados para asegurar su homogeneidad. Los polvos para uso en inyectables deben ser estériles y libres de partículas extrañas.

A1.12

Producción.

Operaciones involucradas en el procesamiento de insumos para transformarlos en un producto intermedio o fármaco.

A1.13

Producto a granel.

Producto en cualquier etapa del proceso de producción antes de su acondicionamiento primario.

A1.14

Producto intermedio.

Material obtenido durante etapas de la producción antes de convertirse en producto a granel.

A1.15

Producto semiterminado.

Producto que se encuentra en su envase primario y que será sometido a etapas posteriores para convertirse en producto terminado.

A1.16**Producto terminado.**

Al medicamento en su presentación final.

A1.17**Reporte.**

Es el documento de la realización de operaciones, proyectos o investigaciones específicas, que incluye resultados, conclusiones y recomendaciones.

A1.18**Sistemas críticos.**

Son aquellos que tienen impacto directo en los procesos y/o productos.

A1.19**Supositorio.**

Preparado sólido a temperatura ambiente, que contiene el o los fármacos y aditivos; de forma cónica, cilíndrica o de bala, destinado a ser introducido. Se funde, ablanda o se disuelve a temperatura corporal.

A1.20**Tableta o comprimido.**

Forma sólida que contiene el o los fármacos y aditivos, obtenida por compresión de forma y tamaño variable. Puede estar recubierta por una película compuesta de mezclas de diversas sustancias tales como: polímeros, colorantes, ceras y plastificantes, entre otros.

A1.21**Ubicuo.**

Se aplica a los organismos que están distribuidos en gran cantidad en muy diversos medios y dotados de una gran capacidad de adaptación a los cambios del entorno

A1.22**UFC.**

Unidades formadoras de colonias.

A1.23**Validación.**

Evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación científicas de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, a lo largo de todo el ciclo de vida de un producto, cuya finalidad es demostrar la funcionalidad, consistencia y robustez de un proceso dado en cuanto a su capacidad para entregar un producto de calidad.

— ANEXO 2 —
MATERIAL EMPLEADO

A2.01 Material.

- ✓ Cajas petri estériles de 90 x 15 mm
- ✓ Agar Soya Trypticaseína
- ✓ Agar Dextrosa Sabouraud
- ✓ Caldo Soya Trypticaseína
- ✓ Caldo Rappaport Vassiliadis
- ✓ Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
- ✓ Agar Cetrimida
- ✓ Caldo Mossel
- ✓ Caldo Dextrosa Sabouraud
- ✓ Caldo Mac Conkey
- ✓ Agar Mac Conkey
- ✓ Agar Glucosa Rojo Violeta Bilis
- ✓ Agar Sal Manitol
- ✓ Pipetas graduadas de 10 mL estériles
- ✓ Tubos de ensaye con buffer de Fosfatos pH= 7.2 estériles
- ✓ Balanza semi analítica marca OHAUS
- ✓ Espátulas estériles
- ✓ Perilla
- ✓ Potenciometro marca HANNA
- ✓ Campana de bioseguridad marca Veco
- ✓ Autoclave marca FAER

A2.02 Cepas microbianas.¹

- ✓ *Candida albicans* ATCC 10231
- ✓ *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 8739
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

¹ Disponibles en American Type Culture Collection 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 (<http://www.atcc.org>)

— ANEXO 3 —
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A3-01

Solución reguladora de fosfatos pH 7.2.

Disuelve en un matraz de 1000 mL 34 g de fosfato de potasio monobásico en 500 mL de agua purificada. Ajusta el pH a 7.2 ± 0.1 con una solución de hidróxido de sodio 1 N. Mezcla y lleva a volumen de 1000 mL con agua purificada.

A3-02

Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 diluida.

Transfiere de la solución anterior 1.3 mL a un matraz volumétrico de 1000 mL y agrega 500 mL de agua purificada. Ajusta el pH a 7.2 ± 0.1 con una solución de hidróxido de sodio 1 N. Mezcla y lleva a volumen de 1000 mL con agua purificada. Transfiere 9 mL de esta solución a tubos de ensaye, para su posterior esterilización en la autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizados se conservan en refrigeración hasta su uso, en un periodo no mayor de siete días.

Nota: En caso de emplear Tween 80 para las muestras insolubles en agua, agregar 1 gramo de Tween 80 por cada litro de *Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 diluida* y homogeneizar.

— ANEXO 4 — SISTEMA API®

Los sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo con el tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras.

A4-01 API® 20 E.

Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos Gram-negativos. Es una galería conformada por 20 microtubos como se muestra en la Figura 14.

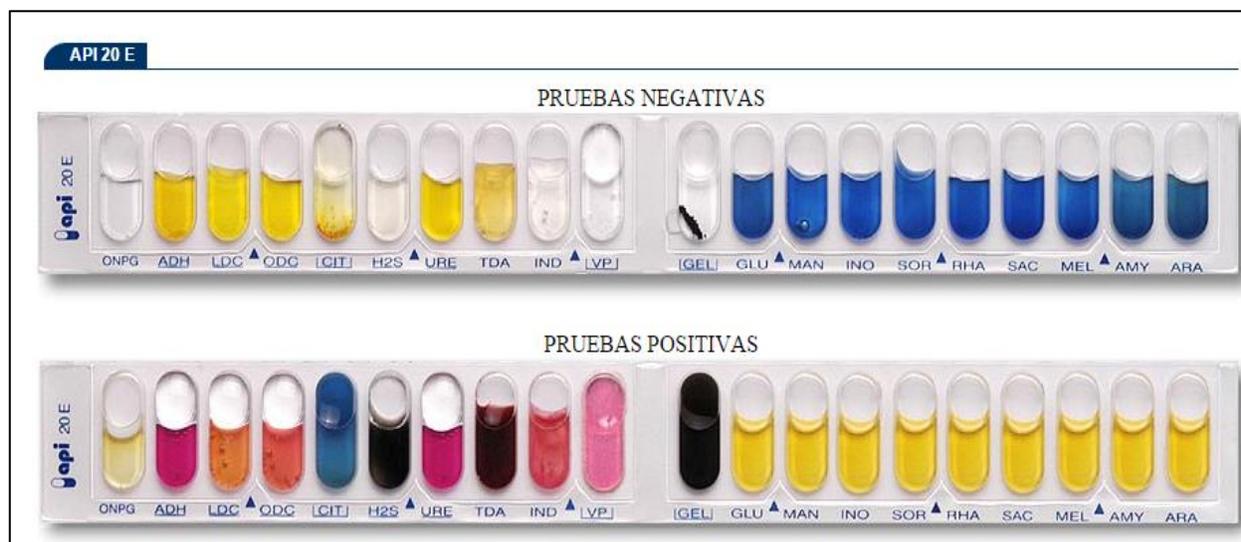


Figura 14. Sistema API® 20 E. Propiedad de bioMeriéux México S.A. de C.V.

A4-01.1 Fundamento.

Se basa en la reacción enzimática del microorganismo, esta reacción es colorimétrica, por lo que dependiendo de la coloración después del periodo de incubación, se puede determinar si reacciona o no, con lo cual se arroja un código el cual es leído por un software, y con ello nos ayuda a conocer de qué microorganismo se trata y que tan confiable es el resultado obtenido.

Tabla 5.
Pruebas con sus respectivas enzimas y resultados.

Prueba	Reacción /Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	Beta-galactosidasa	Sin color	amarillo
ADH	Arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	Utilización del citrato	verde	Azul oscuro o turquesa
H ₂ S	Producción de H ₂ S	Sin precipitado negro	precipitado negro
URE	Ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	Triptófano desaminado	amarillo	marrón-rojo
IND	Producción de indol	amarillo	rosa-rojo
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	Sin color	rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	Sin difusión	Difusión de pigmento
GLU	Fermentación/oxidación de la glucosa	Azul o verde	amarillo
MAN	Fermentación/oxidación demanitol	Azul o verde	amarillo
INO	Fermentación/oxidación de inositol	Azul o verde	amarillo
SOR	Fermentación/oxidación sorbitol	Azul o verde	amarillo
RHA	Fermentación/oxidación de la ramnosa	Azul o verde	amarillo
SAC	Fermentación/oxidación de la sacarosa	Azul o verde	amarillo
MEL	Fermentación/oxidación de la melobiosa	Azul o verde	amarillo
AMY	Fermentación/oxidación de la amigdalina	Azul o verde	amarillo
ARA	Fermentación/oxidación de la arabinosa	Azul o verde	amarillo

Fuente: bioMeriéux.

A4-02
API® 20 C AUX.

La Figura 15 muestra la galería empleada para la identificación de Levaduras.

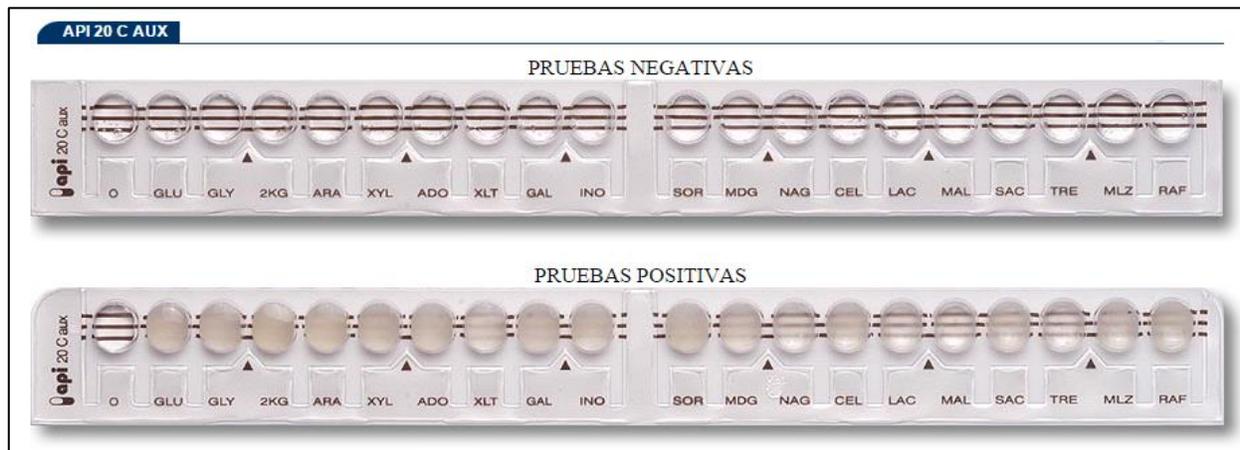


Figura 15. Sistema API® 20 C AUX. Propiedad de bioMeriéux México S.A. de C.V.

A4-02.1 Fundamento.

Se basa en la reacción enzimática del microorganismo, esta reacción produce turbidez, por lo que dependiendo si hay turbidez o no después del periodo de incubación, se puede determinar si reacciona o no, con lo cual se arroja un código el cual es leído por un software, y con ello nos ayuda a conocer de qué microorganismo se trata y que tan confiable es el resultado obtenido.

Tabla 6.

Ensayos y sustratos correspondientes.

Ensayos	Sustratos	Ensayos	Sustratos
0	Ninguno	SOR	D-sorbitol
GLU	D-glucosa	MDG	Metil-alfa-D-glucopiranosida
GLY	Glicerol	NAG	N-acetil-glucosamina
2KG	2-ceto-gluconato cálcico	CEL	D-celobiosa
ARA	L-arabinosa	LAC	D-lactosa (origen bovino)
XYL	D-xilosa	MAL	D-maltosa
ADO	Adonitol	SAC	D-sacarosa
XLT	Xilitol	TRE	D-trehalosa
GAL	D-galactosa	MLZ	D-melezitosa
INO	Inositol	RAF	D-rafinosa

Fuente: bioMeriéux.

A4-03
API® Staph.

Este sistema permite la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*. La Figura 16 muestra la galería.

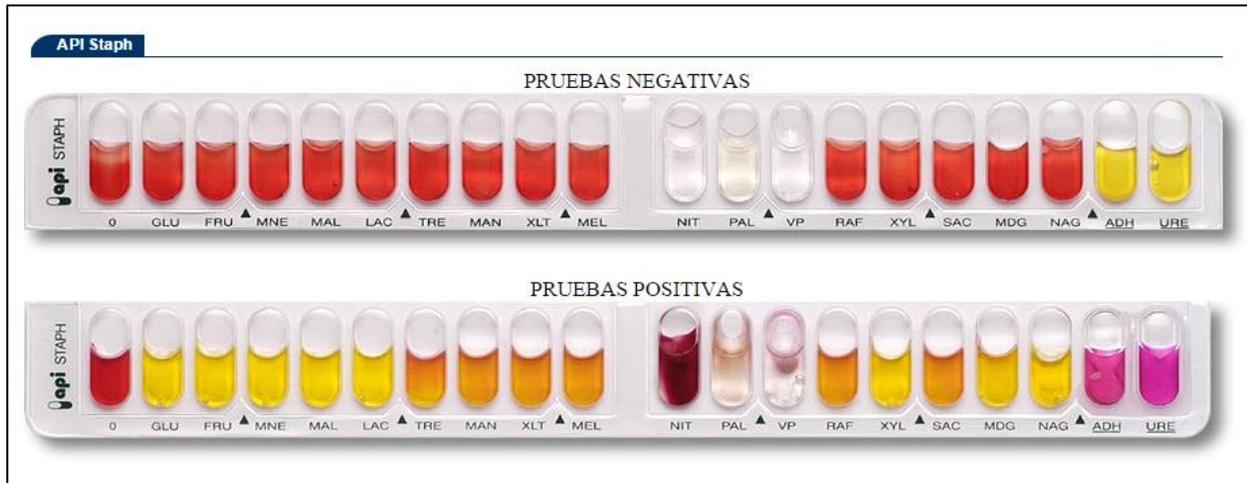


Figura 16. Sistema API® Staph. Propiedad de bioMérieux México S.A. de C.V.

A4-03.1 Fundamento.

Se basa en la reacción enzimática del microorganismo, esta reacción es colorimétrica, por lo que dependiendo de la coloración después del periodo de incubación, se puede determinar si reacciona o no, con lo cual se arroja un código el cual es leído por un software, y con ello nos ayuda a conocer de qué microorganismo se trata y que tan confiable es el resultado obtenido.

Tabla 7.

Pruebas, sustratos y reacciones.

Prueba	Componentes activos	Reacciones / enzimas
0	SIN SUSTRATO	TESTIGO NEGATIVO
GLU	D-GLUCOSA	TESTIGO POSITIVO
FRU	D-FRUCTOSA	ACIDIFICACIÓN
MNE	D-MANOSA	ACIDIFICACIÓN
MAL	D-MALTOSA	ACIDIFICACIÓN
LAC	D-LACTOSA	ACIDIFICACIÓN
TRE	D-TREHALOSA	ACIDIFICACIÓN
MAN	D-MANITOL	ACIDIFICACIÓN

Prueba	Componentes activos	Reacciones / enzimas
XLT	XILITOL	ACIDIFICACIÓN
MEL	D-MELIBIOSA	ACIDIFICACIÓN
NIT	NITRATO DE POTASIO	REDUCCIÓN DE NITRATOS A NITRITOS
PAL	β-NAFTI FOSFATOS	FOSFATASA ALCALINA
VP	PIRIVATO DE SODIO	PRODUCCIÓN DE ACETIL-METIL-CARBINOL
RAF	D-RAFINOSA	ACIDIFICACIÓN
XYL	D-XILOSA	ACIDIFICACIÓN
SAC	D-SACAROSA	ACIDIFICACIÓN
MDG	METHIL-αDGLUCOPIRANOSIDA	ACIDIFICACIÓN
NAG	N-ACETIL-GLUCOSAMINA	ACIDIFICACIÓN
ADH	L-ARGININA	ARGININA DIHIDROLASA
URE	UREA	UREASA

Fuente: bioMeriéux.

A4-04 API® 50 CHB.

Sistema (ver Figura 17) empleado para la identificación del género *Bacillus*.

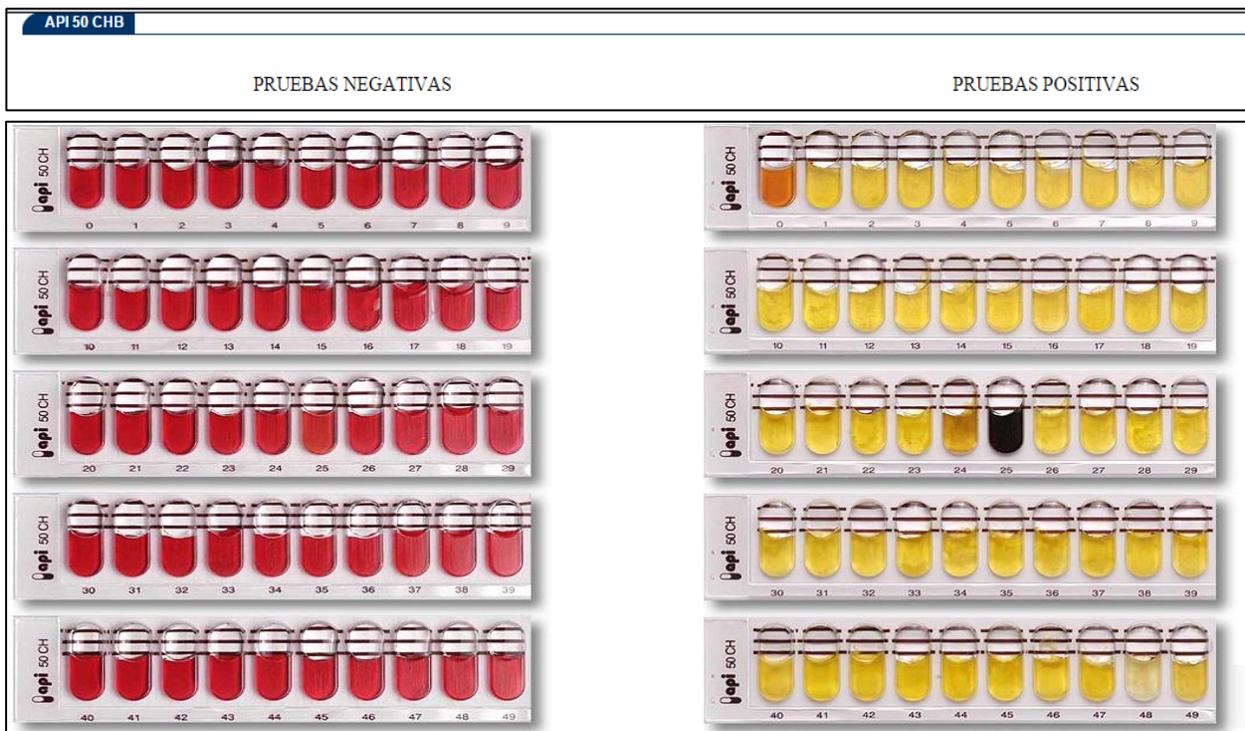


Figura 17. Sistema API® CHB. Propiedad de bioMeriéux México S.A. de C.V.

A4-04.1 Fundamento.

Se basa en la reacción enzimática del microorganismo, esta reacción es colorimétrica, por lo que dependiendo de la coloración después del periodo de incubación, se puede determinar si reacciona o no, con lo cual se arroja un código el cual es leído por un software, y con ello nos ayuda a conocer de qué microorganismo se trata y que tan confiable es el resultado obtenido.

A4-05

Inoculación.

Cada microtubo del sistema debe inocularse con una suspensión en solución salina al 0,85% de un cultivo puro del microorganismo a ser identificado. En algunos casos estos microtubos deben llenarse completamente con la suspensión, mientras que en otros se requiere del añadido de parafina líquida estéril, que proporciona las condiciones anaeróbicas necesarias. Todas las instrucciones para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada uno de los microtubos, y las condiciones de incubación se pueden encontrar claramente especificadas en los instructivos de uso señalados por el fabricante para cada tipo de galería.

A4-06

Interpretación.

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reacciona con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado. La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo con esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-). Después del periodo de incubación y comparar, con la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante (ver Figura 18).

Los datos obtenidos pueden transformarse en un código denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla. En algunos sistemas miniaturizados se recomienda la realización de pruebas bioquímicas opcionales, que permiten obtener dos dígitos adicionales. El código obtenido se corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo con la información contenida en las bases de datos suministradas por el

fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica ingresando al link <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>



Figura 18. Ejemplo de lectura de sistema API®. Elaboración propia.

— ANEXO 5 —
MICROORGANISMOS DE PRUEBA

Tabla 8.
Microorganismos para prueba de medios de cultivo.

Prueba/Medio	Propiedad	Microorganismo de prueba
	Bacterias Gram-negativas bilis-tolerantes	
Caldo Mossel	Promotores del crecimiento	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Inhibitorio	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
Agar violeta rojo violeta bilis	Promotores del crecimiento	<i>P. aeruginosa</i>
	Inhibitorio	<i>S. aureus</i>
MacConkey Caldo	Prueba para <i>Escherichia coli</i>	
	Promotores del crecimiento	<i>E. coli</i>
	Inhibitorio	<i>S. aureus</i>
MacConkey Agar	Promotores del crecimiento + indicativo	<i>E. coli</i>
	Inhibitorio	<i>S. aureus</i>
Rappaport Vassiliadis Salmonella	Prueba para <i>Salmonella sp.</i>	
	Promotores del crecimiento	<i>S. typhimurium</i>
	Inhibitorio	<i>S. aureus</i>
Agar Xilosa lisina desoxicolato	Promotores del crecimiento + indicativo	<i>S. typhimurium</i>
	Indicativo	<i>E. coli</i>
Agar Cetrimida	Prueba para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Promotores del crecimiento	<i>P. aeruginosa</i>
	Inhibidor	<i>E. coli</i>
Agar sal manitol	Prueba para <i>Staphylococcus aureus</i>	
	Promotores del crecimiento + indicativo	<i>S. aureus</i>
	Inhibitorio	<i>E. coli</i>
Caldo Dextrosa Sabouraud	Prueba para <i>Candida albicans</i>	
	Promotores del crecimiento	<i>C. albicans</i>
Agar Dextrosa Sabouraud	Promotores del crecimiento + indicativo	<i>C. albicans</i>
Agar Soya Trypticaseína	Prueba para Mesófilicos aerobios	
	Promotores del crecimiento	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhimurium</i>
	Inhibitorio	<i>A. brasiliensis</i>