

2ej
101



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Química

**"Elaboración de un Manual de Metodos
Microbiológicos para el Control de las
Diferentes Formas Farmaceuticas"**

Trabajo Monográfico

Que para obtener el Título de

Químico Farmacéutico Biólogo

p r e s e n t a

Rosa de Guadalupe Ramos Guisa



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	PROF: ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
VOCAL	" JOSE LUIS IBARMEA AVILA
SECRETARIO	" RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR
1er. SUPLENTE	" ISAURA LUISA CARRERA GARCIA
2do. SUPLENTE	" SANTIAGO MAZA AGUIRRE

Sitio donde se desarrollo el tema:

ICN FARMACEUTICA, BIBLIOTECA FACULTAD DE QUIMICA Y BANCO BIBLIOGRAFICO
DEL CENTRO DE INFORMACION CIENTIFICA Y HUMANISTICA.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

M. EN C. RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR

Nombre completo y firma del sustentante:

ROSA DE GUADALUPE RAMOS GUIZA

INDICE

- I) INTRODUCCION
- II) GENERALIDADES
- III) CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS MICROORGANISMOS
- IV) FORMAS FARMACEUTICAS QUE REQUIEREN CONTROLES MICROBIOLOGICOS
- V) MEDIOS DE CULTIVO
- VI) CONCLUSIONES
- VII) BIBLIOGRAFIA

I

INTRODUCCION

"ELABORACION DE UN MANUAL DE METODOS MICROBIOLÓGICOS PARA
EL CONTROL DE LAS DIFERENTES FORMAS FARMACÉUTICAS".

INTRODUCCION

La necesidad de establecer manuales ha alcanzado, en muy pocos años relativamente, un significado importante en la administración de todas las compañías puesto que basándose en ellos y conociendo la organización, políticas y responsabilidades a seguir se obtendrán mejores resultados, ya que conociendo de antemano que el factor humano es determinante en cualquier labor, y más aún cuando se trata de productos farmacéuticos, debemos de garantizar que los errores se minimizen al máximo siguiendo manuales que señalen la actividad del personal. El objetivo de este manual es que sirva como ayuda y consulta para el personal encargado de investigar y realizar el control Microbiológico de las diferentes formas farmacéuticas.

El control Microbiológico junto con el control Químico y Físico forman parte del Control de Calidad de una forma farmacéutica, este control Microbiológico es de interés e importancia, ya que al realizarlo se determina la presencia o ausencia de contaminantes vivos que pueden dañar tanto a la forma farmacéutica como al consumidor. El daño a la forma farmacéutica sería un cambio en su aspecto, olor, sabor, consistencia, descomposición, intolerancia y disminución de actividad. El daño al consumidor sería originarle otro tipo de infección, estado de inconsciencia y en casos extremos la muerte.

Sin embargo en las diferentes farmacopeas y normas oficiales no existen límites microbianos para todas las formas farmacéuticas y los métodos microbiológicos están referidos a un número reducido de ellas dependiendo ya sea por el agente terapéutico que contiene, o bien por el excipiente o por la vía de administración que se les de.

En el presente trabajo se hace una recopilación de los métodos microbiológicos aprobados por las diferentes farmacopeas para el control de materia prima y aplicados para formas farmacéuticas estériles o no estériles. Se describen características generales de los microorganismos que pueden encontrarse con más frecuencia, los fundamentos y procedimientos de los métodos, consideraciones previas al desarrollo de los procedimientos y propiedades de los medios de cultivo empleados.

II

GENERALIDADES

GENERALIDADES

En formas farmacéuticas estériles, la calidad microbiológica esta asociada con la ausencia de microorganismos o de sus subproductos. Actualmente y durante la pasada decada, el interes ha aumentado de saber el contenido microbiológico en formas farmacéuticas no estériles debido a que muchos productos no estériles proporcionan un medio adecuado para el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos. Aunque la industria farmacéutica reconoce la necesidad de efectuar un control microbiológico a estas formas farmacéuticas no estériles que son susceptibles a la contaminación microbiana, es impráctico e innecesario insistir que el producto no estéril este libre de microorganismos, pero para la protección del consumidor y del producto es importante, sin embargo, tomar medidas apropiadas para asegurar la calidad microbiológica de el producto. El mantenimiento de niveles bajos de microorganismos en productos no estériles es muy importante para asegurar que el producto final este libre de microorganismos no deseados, particularmente patógenos.

Se requiere delinear un programa que además de medir el proceso del control microbiológico de formas farmacéuticas no estériles proporcione la identificación de microorganismos y las fuentes potenciales de contaminación microbiológica, las cuales serán entonces analizadas por su contribución en cuanto a riesgo de contaminación para la calidad microbiológica de el producto. Por ejemplo materias primas, agua utilizada en la manufactura del producto, sistemas preservativos y prácticas de sanitización usadas para el equipo de producción son bien conocidos como factores altamente peligrosos de contaminación y han sido implicados en la contaminación de formas farmacéuticas no estériles. Una atención adecuada y comprensión apropiada del papel de los factores de alto riesgo pueden minimizar el número y el

tipo de contaminantes microbianos que crecen en el producto.

Otros aspectos de atención serán dirigidos hacia "las áreas de alto riesgo" como son pisos, paredes y otras superficies en contacto con el producto. También el aire del medio ambiente puede contener reservorios de microorganismos, sin embargo el riesgo de contaminación proveniente de estas fuentes es bajo en un medio que es adecuadamente limpio y sanitizado. No obstante, aunque el riesgo de contaminación hacia el producto desde las superficies y aire ambiental es pequeño hay una necesidad de programar dentro del control microbiológico estas áreas rutinariamente. El microbiólogo puede sin embargo, hacer pruebas del aire ambiental y superficies como una medida especial, cuando aparece que cierta parte del medio circundante puede ser asociado con la contaminación de un producto.

Materias primas, equipo o soporte del sistema son considerados bastantes importantes para la prueba microbiológica, además es necesario establecer niveles cuantitativos y/o cualitativos de alerta y acción. Un nivel de alerta es un valor que muestra todo objeto llevado por una corriente fuera de las condiciones normales, esto indica, que las cuentas microbianas son más altas que las esperadas y entonces se llamará la atención a producción. Un nivel de acción es un valor, el cual se derivó de un objeto llevado fuera de las condiciones normales de operación y requieren una acción correctiva. Los niveles de acción precipitan una investigación para determinar la causa(s) de tal contaminación (objeto) y ver que medidas correctivas - pueden ser llevadas.

PRUEBA MICROBIOLÓGICA DEL AGUA.-En el pasado reciente la industria farmacéutica ha experimentado varios costosos llamados de atención por la presencia de un alto número de microorganismos indeseables en líquidos nasa-

les y orales. La industria también ha afrontado llamados de atención en líquidos desinfectantes y antisépticos por la misma razón. En la mayoría de los casos los microorganismos han aparecido originariamente en el agua usada para fabricar el producto. Ciertamente, el agua es probablemente el material más importante usado en la manufactura de productos farmacéuticos no estériles. El agua es usado no solamente en la formulación de la mayoría de farmacéuticos no estériles sino también en el lavado del equipo y componentes. Como resultado la calidad microbiológica de el agua es extremadamente importante. El agua suministrada será sujeta a frecuentes chequeos microbiológicos, sobre todo cuando el agua para beber no evita la presencia de microorganismos tales como *Pseudomonas aeruginosa* o *Ps cepacia*. Otros microorganismos, aunque inocuos al consumidor, pueden presentarse en número suficiente para causar problemas con la calidad del producto (por ejemplo: sabor, cambios de olor, decoloración, etc.).

Aún si el agua es satisfactoria, la contaminación puede ocurrir durante el tratamiento de almacenaje. Por ejemplo, los sistemas de la deionización del agua son bien conocidos como sitios de crecimiento para microorganismos, y el programa microbiológico es necesario en varias etapas a lo largo del sistema de deionización (resinas intercambiadoras aniónicas, catiónicas, - mezcla de resinas, etc.). Los microorganismos pueden crecer prolíficamente cuando el agua no es almacenada a altas temperaturas o cuando los tanques de almacenaje no son rutinariamente sanitizados. Codos (ángulos) y curvas en la distribución del sistema también pueden coleccionar microorganismos y pueden llegar a ser fuentes mayores de crecimiento microbiano en el sistema.

Por estas razones es esencial la validación de estudios llevados a cabo para determinar la aceptable calidad microbiológica del agua en el proceso

de generación, almacenaje y sistemas de distribución que provee el agua. Otras validaciones son las del programa rutinario microbiológico que asegure la continua aceptabilidad de el equipo y procedimientos de operación usados para mantener la calidad microbiológica de el agua.

PROGRAMA DE SANITIZACION.- Hay muchos pasos durante la manufactura de formas farmacéuticas no estériles donde las condiciones pueden ser óptimas para el desarrollo de microorganismos. Algunos de estos pasos incluye el granulado humedo, secado, mezclado y almacenaje. De este modo, uno de los factores fundamentales en la producción de formas farmacéuticas no estériles de alta calidad es la adherencia escrupulosa a las buenas prácticas de sanitización del equipo de proceso. Una buena producción higiénica puede ayudar a prevenir los microorganismos desde el comienzo y durante las etapas de manufactura del producto.

Aunque una eficiente sanitización es esencial, una planta y equipo sucios pueden hacer esta tarea difícil o virtualmente imposible. Por ejemplo las mangueras y válvulas que no pueden ser propiamente saneadas sobre todo en extremos cerrados, hendiduras y toda válvula "no sanitaria" hacen difícil la sanitización.

Los métodos usados para evaluar los agentes de sanitización pueden ser divididos en dos categorías: pruebas estándares de laboratorio y pruebas bajo condiciones actuales de uso. Una combinación de ambos métodos probablemente provee la más completa validación para el proceso de sanitización. Por ejemplo, los métodos estándares de laboratorio tales como el AOAC Available Chlorine Germicidal Equivalent Test, el AOAC Germicidal and Detergent Sanitizer Test, y el AOAC Use Dilution Test son específicamente definidos por su reproducibilidad en cualquier laboratorio y por cualquier ope-

rador. Estas pruebas estándares de laboratorio son útiles para comparar la sanitización de varios productos, en varias diluciones, tiempos de exposición, temperatura, etc. El agente de sanitización puede ser desafiado en solución en varias pruebas con microorganismos, los cuales parecen ser esperados en el medio de manufactura. Por las condiciones variantes de exposición y la cinética de la fase de muerte microbiana pueden ser determinadas por el agente de sanitización adecuado bajo estudio.

Un agente de sanitización puede frustrar su alto poder germicida por las condiciones en las cuales se use, ya sea por factores esperados y no esperados, tales como personal, procedimiento, tiempo en contacto, resistencia de la suciedad, agua endurecida, tipo de superficie (porosa o no porosa), tipo y condición de limpieza empleada y dependientes químicas. Como dos plantas farmacéuticas no comparten las mismas condiciones operacionales es importante determinar el cumplimiento del agente sanitizante bajo condiciones actuales de uso y tan bien bajo condiciones estándares de laboratorio. Un programa dentro del control microbiológico del uso del agente sanitizante informará la frecuencia adecuada de las sanitizaciones y podrá no solamente enumerar los contaminantes, sino también identificarlos e indicar cuales microorganismos son más resistentes al germicida.

Una vez que el procedimiento de sanitización es debidamente validado deben realizarse una descripción escrita detallada de los métodos, equipo y materiales usados, también como los parámetros críticos de sanitización (por ejemplo: tipo y concentración del agente sanitizante, tiempo en contacto, temperatura, tipo del agua usada, etc.), cuando un producto en particular resulta contaminado el microbiólogo puede iniciar una evaluación microbiana especial de el procedimiento de sanitización como una medida de seguridad. Cuando la validación del proceso de sanitización es cambiado, nuevamente

estudios podrán ser llevados a cabo para evaluar cualquier efecto si es que lo hay de las nuevas condiciones que se tienen para la efectividad de el procedimiento.

PRUEBA DE EFICACIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.- Otro factor importante relacionado en el control microbiológico de productos no estériles es la formulación. Al igual que existen requerimientos rígidos para una manufactura higiénica, uso de buenas prácticas de manufactura y control de calidad, la mayor parte de los productos farmacéuticos no estériles están todavía sujetos a una contaminación secundaria de fermentos, mohos y bacterias. El grado de susceptibilidad es generalmente relacionado con productos del agua y contenido nutriente. Los preservativos (conservadores) antimicrobianos son usualmente agregados a un fluido no estéril o a una pomada ya sea para inhibir el desarrollo de microorganismos que son introducidos inadvertidamente durante el proceso de manufactura o para la minimización de la proliferación de microorganismos. Los agentes antimicrobianos no pueden ser usados para enmascarar prácticas no sanitarias o como un sustituto de las buenas prácticas de manufactura. Muchos factores influyen en la efectividad de un preservativo antimicrobiano, el producto mismo afecta la elección de un preservativo y la cantidad de él para ser usado, el agua activa del producto, las propiedades antimicrobianas de ingredientes específicos en la formulación, y el rango de pH que pueden tener. Por lo tanto, los preservativos pueden malograr su efectividad antimicrobiana por la interacción con ingredientes de la formulación o con componentes de el contenedor en el cual el producto es acondicionado.

En resumen para comprobar la inocuidad de los productos farmacéuticos no estériles se debe realizar la prueba de la eficacia de los preservativos, así mismo establecer que sistema preservativo es más potente, suficiente para prevenir el crecimiento de fermentos, mohos y bacterias en el producto

durante condiciones de uso por el consumidor.

Los métodos para examinar la eficacia de el preservativo usualmente siguen los lineamientos de la USP o de la Cosmetic Toiletry and Fragrance Association. Estos métodos implican que al material a prueba se agregue un estándar de microorganismos y entonces determinar el número de sobrevivientes, en subsecuentes intervalos de tiempo, para asegurar que el sistema preservativo inactiva a los microorganismos desafiados.

MATERIAS PRIMAS.- Las materias primas son una de las mayores fuentes de contaminación microbiana en formas farmacéuticas no estériles. Ciertamente la USP reconoce la importancia que tienen algunas materias primas como una fuente de contaminación microbiana y debido a esto se les exige cumplir ciertos requisitos para aprobar la prueba de su calidad microbiológica. En consecuencia, esto es importante para planear el muestreo, pruebas de los procedimientos, y las especificaciones serán desarrolladas para asegurar la calidad microbiológica deseada de materias primas.

Dada la diversidad de materias primas usadas en la industria, un solo criterio no es suficiente para establecer un programa de pruebas. La naturaleza y extensión de pruebas microbiológicas para las materias primas son basadas en el conocimiento de la materia, esto origina, cual es el más usado y estadísticamente más experimentado. Materias provenientes de fuentes ya sean animales, vegetales o minerales podrán dar un énfasis especial de atención porque ellas son conocidas como nocivos reservorios de microorganismos. Sin embargo existen materias primas consideradas microbicidas, por ejemplo la acetona, que no requiere prueba microbiológica porque tiene actividad intrínseca antimicrobiana. Las materias primas pueden ser examinadas por los métodos de la USP (número de bacterias permitido), microorganismos

objetables, o microorganismos que pueden tener la capacidad de degradar al producto.

Un programa de rutina para medir la calidad microbiológica de materias primas permite: (1) identificar materias primas que son más susceptibles a una contaminación microbiana, (2) investigar la fuente y especies características de microorganismos contaminantes, y (3) tomar medidas para la reducción y/o exterminio de microorganismos (por ejemplo; irradiación, óxido de etileno, calor, filtración, etc.). Es muy importante mantener bajos los niveles de población de microorganismos en materias primas para ayudar a asegurar que el producto final esta libre de microorganismos indeseados, - particularmente patógenos. Un programa llevado a cabo para el control de la calidad microbiológica de materias primas minimiza las posibilidades de - contaminación en el producto farmacéutico terminado.

PRUEBAS AL PRODUCTO TERMINADO.- La prueba al producto terminado es generalmente al final del programa designado para asegurar la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles. Esta fase de un programa de control microbiológico proporciona una seguridad adicional de la calidad del producto. Por ser la prueba microbiológica destructiva, es necesario solamente una muestra representativa de cada contenedor. El tipo de prueba ejecutada y la extensión de ella es gobernada por el uso de el producto (por ejemplo; la vía de administración), la naturaleza del producto y el riesgo potencial al consumidor. Un programa de prueba establecido para un producto que se administra tópicamente difiere del usado para formas de dosificación oral porque la microbiología concerniente asociada con farmacéuticos tópicos difieren de los microorganismos asociados con farmacéuticos administrados oralmente.

III

CARACTERISTICAS

GENERALES DE LOS MICROORGANISMOS

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS MICROORGANISMOS

El estudio de la Microbiología incluye los siguientes grupos de microorganismos: 1) algas, 2) protozoarios, 3) bacterias, 4) hongos, 5) organismos del tipo de la pleuroneumonía (PPLDO), 6) rickettsias y 7) virus, los cuales difieren en características como forma, nutrición, estructura, tamaño, composición química, forma de reproducción, etc.

Para efectos prácticos de este manual a continuación se describen algunas características generales de Bacterias, Hongos y de los siguientes microorganismos patógenos: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* que pueden encontrarse con más frecuencia en las formas farmacéuticas.

BACTERIAS.- Las bacterias están constituidas por células procarióticas relativamente simples, poseen envoltura celular, en capas que incluye la membrana plasmática, la pared celular, las proteínas y polisacáridos asociados a algunas cápsulas o adherentes superficiales externas, pueden presentar apéndices filamentosos conocidos como flagelos o cilios.

Las estructuras citoplasmáticas incluyen una red de cromatina fibrilar central o un cuerpo nuclear rodeado por un citoplasma amorfo que contiene ribosomas, no producen organelos internos como mitocondrias, membranas nucleares, retículo endoplásmico; algunos géneros poseen endosporas como Bacillus, Clostridium y Sporasarcina que las forman durante su fase estacionaria de crecimiento, después que se ha agotado el suministro de algunos nutrientes del medio. Dentro de una célula vegetativa se produce una sola espora que se diferencia de la célula madre en su morfología y composición, mayor resistencia a ambientes adversos y ausencia de actividad metabólica.

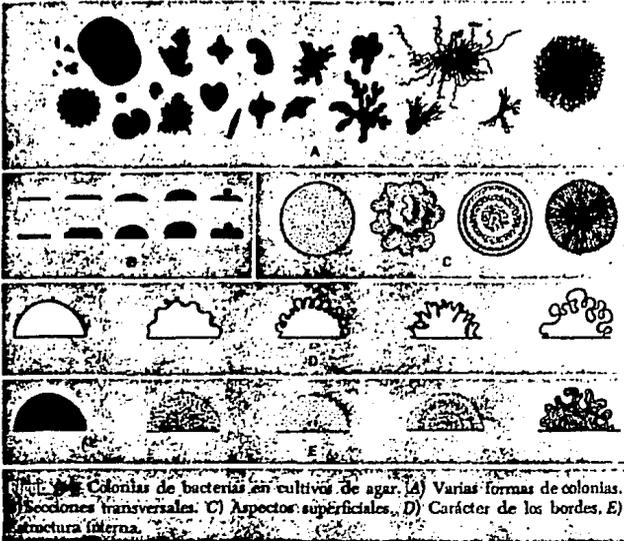


Fig. 1. Colonias de bacterias en cultivos de agar. A) Varias formas de colonias. B) Secciones transversales. C) Aspectos superficiales. D) Carácter de los bordes. E) Estructura interna.

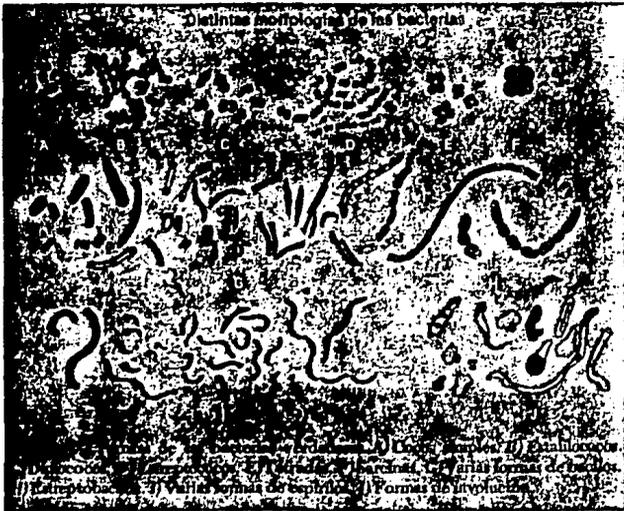


Fig. 2. Distintas morfológicas de las bacterias. A) Cocci. B) Bacilli. C) Spirilla. D) Vibrios. E) Filamentosas. F) Otras formas de bacterias.

La mayor resistencia de las esporas a los efectos letales de la desecación, la congelación, la radiación y algunas sustancias químicas es de gran importancia y entre sus características sobresalientes están su gran longevidad en el suelo, junto con su capacidad para germinar en condiciones ambientales inadecuadas.

Pared celular.-Es una estructura fuerte y rígida que la protege de daños físicos, cambio de presión osmótica y sirve de sostén para las partes más débiles y bioquímicamente más activas de la célula, es más delgada en las bacterias grampositivas, la diferencia en su composición sirve de base para la clasificación bacteriana en grampositivas y gramnegativas.

Reproducción.- Cuando se coloca a las bacterias en un medio de cultivo completo, la célula bacteriana crece y se divide para formar dos células hijas, proceso denominado fisión binaria, como resultado obtenemos una curva de crecimiento en la que se diferencian cuatro fases principales: 1) fase de latencia, 2) fase exponencial, 3) fase estacionaria y 4) fase de muerte; estas fases reflejan el estado metabólico de los microorganismos en ese momento particular.

La fase de latencia es el periodo de ajuste necesario para el reabastecimiento de metabolitos celulares hasta un nivel compatible con la síntesis celular.

La fase exponencial es cuando las células se encuentran en un estado de crecimiento balanceado, las células se dividen con un ritmo constante determinado por la naturaleza del microorganismo y por las condiciones ambientales.

Fase estacionaria.- La acumulación de productos de deshecho, el agotamiento de los nutrientes, el cambio en el pH y otros factores ejercen un efecto deletéreo sobre el cultivo, que origina una disminución en la velocidad de crecimiento.

Fase de muerte.- Las células de un cultivo que están nutriendo, se elongan y se distorsionan, lo que es un reflejo del crecimiento desequilibrado.

Como grupo las bacterias son microorganismos muy versátiles, presentan un gran potencial en su capacidad de utilizar para el crecimiento, fuentes de alimentos diversos que van desde sustancias inorgánicas, hasta materias orgánicas sumamente complejas. Muchas especies han aprendido a crecer en una amplia diversidad de nichos ecológicos con temperatura, acidez, humedad o tensiones de oxígeno extremas. La capacidad de las bacterias para existir bajo tales circunstancias, es una prueba de su poder de adaptación y de su capacidad de responder exitosamente a estímulos diferentes.

Dentro de los requerimientos físicos para las bacterias están:

1. Temperatura; Para cada bacteria hay una temperatura óptima en la que los microorganismos crecen con mayor rapidez y un rango de temperatura dentro del cual puede producirse el crecimiento.

Basándose en estos rangos se han dividido a las bacterias en 3 grupos:

Psicrófilas: -5° a 30°C	óptima 10° - 20°C
Mesófilas : 10° a 45°C	óptima 20° - 40°C
Termófilas : 20° a 80°C	óptima 50° - 60°C

La temperatura óptima generalmente es un reflejo del ambiente normal del microorganismo.

2. pH: El pH del medio de cultivo afecta también la velocidad de crecimiento y también hay un pH óptimo con un rango, en el cual puede producirse el

crecimiento. Para la mayoría de las bacterias patógenas, el pH es de 7.2 a 7.6, aunque cualquier ambiente puede ser adecuado para el crecimiento, el desarrollo posterior puede verse severamente limitado por los productos metabólicos de los mismos microorganismos, éste es esencialmente notable en las bacterias que presentan metabolismo fermentativo, con acumulación de ácidos orgánicos inhibidores.

HONGOS.- Están constituidos por células eucarióticas y forman filamentos o hifas que en conjunto se le conoce como micelio. Existen hifas vegetativas que penetran al sustrato y obtienen agua y nutrientes para la planta, hifas reproductoras que crecen sobre el medio y contienen las esporas.

Se reproducen por esporulación sexual y asexual, obtienen el carbono y la energía de carbohidratos, especialmente la glucosa pero algunos utilizan alcoholes o ácidos orgánicos.

El medio húmedo facilita el crecimiento de los hongos pero no requieren el mismo grado de humedad que bacterias y levaduras, toleran cambios de pH mejor que las bacterias, las especies comunes se multiplican a pH de 2.2 a 9.6, aún cuando el pH de 5 a 6 es el más favorable para muchos hongos. La temperatura óptima de crecimiento está entre 22° y 32°C, la máxima de 40° y la mínima de 10°C. Prácticamente todos los hongos son aerobios y requieren oxígeno para su crecimiento.

LEVADURAS.-Son hongos con crecimiento unicelular, sus células son esféricas, elípticas o cilíndricas; su tamaño va de 2-8 por 3-15 micras de longitud. Se multiplican asexualmente por gemación, por fisión binaria y sexualmente por medio de ascosporas, necesitan para crecer los mismos nutrientes que las bacterias y los hongos, en términos generales requieren más a-

agua que los hongos, pero menos que las bacterias, crecen en límites amplios de pH desde 3.0 a 7.5, la reacción óptima se localiza entre 4.5 y 5.0, no hay desarrollo a temperaturas mayores a las de congelación ni a temperaturas mayores de 47°C, la temperatura óptima se encuentra entre 20° y 30°C, utilizan los azúcares en presencia o ausencia de oxígeno.

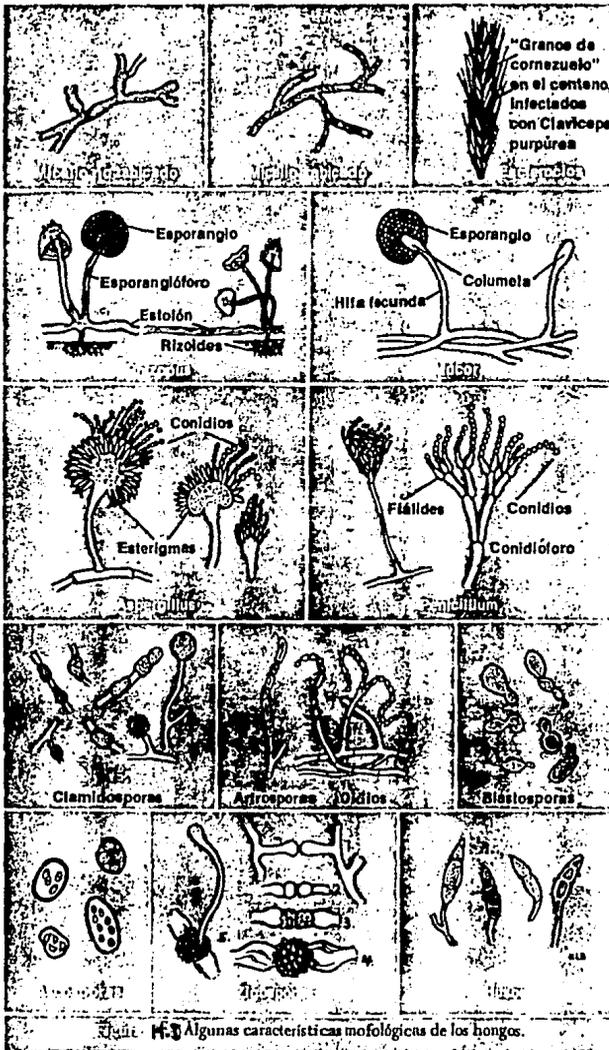


Fig. 1.3. Algunas características morfológicas de los hongos.

CARACTERISTICAS DE MICROORGANISMOS PATOGENOS ENCONTRADOS
CON MAS FRECUENCIA EN LAS FORMAS FARMACEUTICAS

Salmonella.-Son bacilos gramnegativos, unicelulares y en forma de bastones, no esporulan, con diámetro menor de dos micras, usualmente son móviles, aún cuando también se presentan formas sin motilidad, son aerobios, heterótrofos. Las Salmonelas son agentes etiológicos para determinados estados patológicos, tales como gastroenteritis, fiebre paratifoidea y la fiebre tifoidea clásica. Aún cuando son parásitos principalmente del intestino se han reportado varios casos de infecciones extraintestinales. - Su presencia nos indica contaminación con heces fecales, o por medio de portadores sanos del microorganismos.

Escherichia coli.- Son microorganismos unicelulares, no fotosintéticos, no esporulan, son bacilos gramnegativos con diámetro menor de dos micras son móviles mientras otros carecen de movimiento. Son aeróbicos, heterótrofos, fermentadores activos de los carbohidratos. Muchas especies son saprofiticas mientras que otras especies habitan en el intestino como parte de la flora normal bacteriana, en el cual no es patogénico. Por lo general se encuentra en el intestino humano, razón por la cual al hacer el examen bacteriológico del agua, la presencia de E. coli en ella nos indica la contaminación por excreción fecal, por lo tanto no está en condiciones para el consumo humano. Escherichia coli es importante no sólo en relación con los análisis de agua, sino también clínicamente, como causante de varias formas comunes de infecciones. Aunque vive en el intestino humano casi sin causar daño, tiene cierta capacidad para crecer en otras partes del organismo y es un "circunstancial" típico. Es una de las bacterias que con mayor frecuencia producen inflamación de las vías urinarias (cistitis, pielitis) y de la vesícula biliar (colecistitis). Abunda también en los tejidos infectados en muchos casos de apendicitis y peritoní

tis. Ciertas cepas de *Escherichia coli* de tipos serológicos peculiares se han encontrado asociadas con brotes de diarrea infantil en salas de -
pediatría.

Staphylococcus aureus.- Son microorganismos unicelulares esféricos, grampositivos, no esporulan, no fotosintéticos, no móviles, su diámetro es de 0.5- 1.0 micra. Su crecimiento es aeróbico y anaeróbico facultativo. Se encuentran como células individuales formando cadenas o en su forma - característica que es semejando racimos de uvas.

Crecen en medios no enriquecidos y en presencia de altas concentraciones de NaCl (7.5-10%). Pueden producir pigmentación que varía del blanco al naranja o del amarillo al dorado y puede ser Beta hemolítico en gelosa sangre. Las cepas patogénicas son capaces de coagular al plasma sanguíneo; aproximadamente el 97% de los estafilococos asociados con procesos patológicos en el hombre, son capaces de elaborar esta enzima. Los estafilococos se encuentran siempre en la piel humana, nariz, garganta y son organismos de furúnculos y granos.

Pseudomona aeruginosa.-Las pseudomonas son bacilos gramnegativos, unicelulares, rectos o ligeramente curvos, no esporulan. Son microorganismos de menos de dos micras de diámetro, son móviles con flagelos polares, o no móviles (casos raros). Son aeróbicos pero pueden crecer bajo condiciones anaeróbicas. Un gran número de especies producen pigmentos solubles en agua y otros que son fluorescentes, como la piocianina y la floreceína que se di funden en el medio produciendo colonias blanco difusas. Estos bacilos se encuentran frecuentemente en la piel normal y en el intestino en corto nú mero, sin producir daño, pero se multiplican con rapidez, hasta ser el organismo predominante en el intestino u otro lugar del cuerpo, donde las - bacterias sensibles a los antibióticos de la flora normal han sido supri-

midas, o donde los tejidos carecen del grado de resistencia normal a la -
infección. Por lo tanto, este bacilo es "circunstancial" peligroso, capaz
por sí solo, o en compañía de otras bacterias de causar graves y persis-
tentes infecciones en heridas, vías urinarias y en otras partes. En los
niños pequeños y en personas ancianas, cuya resistencia este disminuida -
por otro padecimiento puede originar septicemia o neumonia mortales.

IV
FORMAS FARMACEUTICAS
QUE REQUIEREN
CONTROLES MICROBIOLÓGICOS

FORMAS FARMACEUTICAS QUE REQUIEREN CONTROLES MICROBIOLOGICOS

Todas las formas farmacéuticas requieren control Microbiológico y para su estudio se agrupan dentro de la siguiente clasificación: Formas Farmacéuticas No Estériles y Formas Farmacéuticas Estériles. Consecuentemente, por separado se describen las pruebas que se les efectúa, a cada grupo, para cumplir con su control Microbiológico.

Ia. PARTE

FORMAS FARMACEUTICAS NO ESTERILES

Dentro de las formas farmacéuticas no estériles tenemos a las siguientes:

Sólidos de Aplicación Oral: cápsulas, comprimidos o tabletas (ya sean efervescentes, masticables, solubles, sublinguales), grageas, granulados, gránulos, obleas, pastillas o trociscos, perlas, píldoras y polvos.

Líquidos de Aplicación Oral: elixires, emulsiones, geles, jarabes, soluciones ingeribles, suspensiones ingeribles, tinturas y vinos.

Semisólidos de Aplicación Externa: cremas, emulsiones, geles, jaleas, pastas, polvos, pomadas o ungüentos.

Sólidos para Aplicación Interna: barras o candelillas, cremas vaginales, jaleas, óvulos y supositorios.

El control Microbiológico que se realiza a éstas formas farmacéuticas comprende: A. "La determinación del número de microorganismos"

B. "Identificación del tipo de microorganismo patógeno"

TOMA DE MUESTRAS.- Para efectuar estas pruebas las muestras deben de tomarse de tal manera que la posibilidad de contaminación secundarias quede excluida. Por este motivo la toma de las muestras deberá ser realizada por personal previamente capacitado para este fin. La USP XXI recomienda para el control Microbiológico de un lote, la toma de 3 muestras representativas

cada una de ellas conteniendo 10 ml en caso de productos líquidos o 10 g en caso de productos sólidos. De éstas, una muestra está destinada a la determinación del número de microorganismos y las otras dos muestras son para la determinación del tipo de microorganismo patógeno. En caso de ser producto a granel la cantidad de muestra es de 10 ml (en caso de productos líquidos) o de 10 g (en caso de productos sólidos), y deberá estar constituida por muestras individuales.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS.- Las muestras deben ser tratadas de tal manera que hasta el examen la cantidad y el tipo de microorganismos originalmente presentes no experimenten modificaciones. Las muestras, se colocan bajo condiciones estériles en envases previamente esterilizados, impermeables al agua y al aire, debidamente bien cerrados y protegidos de la luz, hasta el momento de usarse.

Para la determinación del número de microorganismos, la muestra deberá diluirse en forma rápida y homogénea, bajo condiciones estériles, y colocarlas inmediatamente en los medios de cultivo. El medio de dilución, para evitar un aumento del número de microorganismos, no deberá contener sustancias nutritivas ni tener una actividad nociva sobre los microorganismos existentes en el material en examen. La farmacopea nacional de los Estados Unidos de Norteamérica edición XXI indica como medio de dilución, una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2.

DETERMINACION DEL NUMERO DE MICROORGANISMOS.- La determinación se puede realizar empleando cualquiera de los métodos siguientes, o bien según la naturaleza del producto o necesidades del laboratorio, se elegirá el método más adecuado.

Método No 1 Técnica del agar vertido en placas

Método No 2 Técnica del número más probable NMP

Método No 3 Técnica de filtración a través de membrana

Estos métodos pueden aplicarse a preparados líquidos y sólidos solubles en agua, de contenido reducido o elevado de microorganismos. La técnica del filtro de membrana permite además la eliminación de agentes antimicrobianos mediante la filtración.

Cuando el producto es una suspensión acuosa o hidroalcohólica (contienen do menos del 30% de alcohol) y se supone que hay un elevado contenido de - microorganismos se pueden examinar con la técnica del vertido en placas. Y por la técnica del Número Más Probable cuando el contenido de microorganismos es reducido.

Si se tienen productos cuyas sustancias son insolubles en agua o líquidos inmiscibles con agua se transformarán en suspensiones o emulsiones, agregando cantidades mínimas de emulsivos estériles (por ejemplo; tween 80, spans etc.), empleando homogenizadores y calentando a no más de 40°C durante 30 minutos.

DETERMINACION DEL NUMERO DE MICROORGANISMOS POR LA TECNICA DEL AGAR VERTIDO EN PLACA

Por medio de este método se logra obtener la cuenta total de bacterias y la cuenta total de hongos, empleando los medios de cultivo adecuados para cada caso. El siguiente procedimiento se sigue para formas farmacéuticas sólidas y líquidas orales no estériles:

a) CUENTA TOTAL DE BACTERIAS

I.- Pesar 10 gramos si la muestra es sólida, o 10 ml si la muestra es líquida y depositarlos en un frasco estéril, agregar 90 ml de solución amortiguadora de fosfato pH 7.2 para obtener una dilución de 1:10 (Solución A)

- 2.- De la solución A, diluir sucesivamente para obtener diluciones de 1:100 y 1:1000 de la muestra. (Estas mismas soluciones se utilizan para la cuenta total de Hongos).
- 3.- Colocar 1 ml de cada dilución en 2 cajas petri estériles.
- 4.- Para cada caja agregar aproximadamente 20 ml de agar de soya tripticase (fundido y mantenido a 45°C).
- 5.- Mezclar cuidadosamente sobre una superficie plana con movimiento rotatorio y dejar solidificar a temperatura ambiente, después invertir las cajas e incubar a 35°C por 48 horas.
- 6.- Para determinar el número de bacterias, se cuentan las colonias de las dos placas por cada dilución, se toma el valor medio y se multiplica por el factor de dilución. El número de microorganismos se indica por gramo, mililitro o unidades de la muestra ensayada.

b) CUENTA TOTAL DE HONGOS

- 1.- Pesar 10 gramos, si la muestra es sólida, o 10 ml si la muestra es líquida y depositarla en un frasco estéril, agregar 90 ml de solución amortiguadora de fosfato pH 7.2 para obtener una dilución de 1:10 (Solución A).
- 2.- De la solución A, diluir sucesivamente para obtener diluciones de 1:100 y 1:1000 de la muestra.
- 3.- Colocar 1 ml de cada dilución en 2 cajas petri estériles.
- 4.- Agregar aproximadamente 20 ml de agar de dextrosa Sabouraud para cada caja de petri (el agar debe estar fundido y mantenido a 45°C).
- 5.- Mezclar cuidadosamente sobre una superficie plana con movimiento rotatorio y dejar solidificar a temperatura ambiente, después invertir las cajas e incubar a 20°C durante 5 a 7 días.
- 6.- Para determinar el número de hongos se cuentan las colonias presentes en las dos placas por cada dilución, se toma el valor medio y se multiplica por el factor de dilución. El número de microorganismos se indi-

ca por gramo, mililitro o unidades de la muestra ensayada.

Cuando el producto a examinar son cápsulas, píldoras, perlas y semisólidos los procedimientos a seguir para la cuenta total de bacterias y cuenta total de Hongos son los siguientes:

a) CUENTA TOTAL DE BACTERIAS

- 1.- Pesar 10 gramos en caso de ser producto a granel, tomados de diferentes contenedores y depositarlos en un frasco estéril, agregar 90 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, calentar a 40°C no más de 20 minutos, agitar suavemente hasta disolución total. Esta dilución es de 1:10 (Solución A).
- 2.- De la solución A, diluir sucesivamente para obtener diluciones de 1:100 y 1:1000 de la muestra.
- 3.- Colocar 1 ml de cada dilución en 2 cajas petri estériles.
- 4.- Para cada caja agregar aproximadamente 20 ml de agar de soya tripticase (fundido y mantenido a 45°C).
- 5.- Mezclar cuidadosamente y dejar solidificar, después invertir las cajas e incubar a 35°C por 48 horas.
- 6.- Para determinar el número de bacterias, se cuentan las colonias de las dos placas por cada dilución, se toma el valor medio y se multiplica por el factor de dilución. El número de microorganismos se indica por gramo de la muestra ensayada.

b) CUENTA TOTAL DE HONGOS

- 1.- Pesar 10 gramos de las formas farmacéuticas y depositarlos en un frasco estéril, agregar 90 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, calentar a 40°C no más de 20 minutos, agitar suavemente hasta disolución total. Esta dilución es de 1:10 (Solución A).
- 2.- De la solución A, diluir sucesivamente para obtener diluciones de 1:100 y 1:1000 de la muestra.

- 3.- Colocar 1 ml de cada dilución en 2 cajas petri estériles.
- 4.- Agregar aproximadamente 20 ml de agar de dextrosa Sabouraud para cada caja de petri (el medio debe estar fundido y mantenido a 45°C).
- 5.- Mezclar cuidadosamente y dejar solidificar, después invertir las cajas e incubar a 20°C durante 5 a 7 días, para observar el desarrollo.
- 6.- Para determinar el número de hongos, se cuentan las colonias presentes en las dos placas por cada dilución, se toma el valor medio y se multiplica por el factor de dilución. El número de microorganismos se indica por gramo de la muestra ensayada.

TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE

Mediante esta técnica se efectúa una estimación de la densidad de bacterias en la muestra; tal estimación tiene una base estadística, la probabilidad de obtener tubos de cultivo positivos disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

En vista de la variedad de microorganismos presentes en la muestra y dado que sólo un grupo de ellos interesa investigar, se realiza una primera prueba llamada presuntiva cuyo objetivo es enriquecer cada tubo inoculado con este grupo de bacterias. Aquellos tubos que resulten positivos después de la incubación correspondiente (formación de gas, enturbiamiento, cambio de color, etc.) son objeto de un segundo estudio que tiende a comprobar la identidad de los microorganismos; ésta es la prueba confirmativa.

La consulta de tablas llamadas del "Número Más Probable" (NMP), en las que se expresa la concentración de microorganismos que corresponda a cada combinación de tubos positivos, permite obtener los valores buscados. Por su mismo carácter estadístico las cifras consignadas en las tablas consti-

tuyen la mejor estimación que puede hacerse del número de bacterias en la muestra original. Se indican, sin embargo, los límites que con una probabilidad de 0.95 pueden esperarse en cada caso.

PROCEDIMIENTO:

- a. Se selecciona la serie de tubos por utilizar de acuerdo con el grado de contaminación que se sospeche tenga la muestra.
- b. Se marcan e identifican los tubos por inocular.
- c. Se prepara y diluye la muestra con solución amortiguadora pH 7.2 para obtener las siguientes diluciones 1:10, 1:100, 1:1000.

PRUEBA PRESUNTIVA:

- 1.- Se transfiere 1 ml de cada una de las diluciones a cada uno de tres tubos, conteniendo el medio de cultivo correspondiente, evitando todo tipo de contaminación durante el análisis, aplicando la punta de la pipeta en la pared interna del tubo mientras escurre el líquido.
- 2.- Se incuban los tubos a 35°C: se examina a las 24 horas y se observa si hay formación de gas, desarrollo bacteriano (enturbiamiento) y/o vire del indicador, según el grupo microbiano que se esté investigando.
- 3.- Después de la primera lectura se prosigue a la incubación de los tubos por 24 horas más. La presencia de gas, desarrollo bacteriano y/o vire del indicador, según el caso, y después de 48 horas de incubación, se hace positiva la prueba y remite los tubos a la prueba confirmatoria.

PRUEBA CONFIRMATORIA:

- 1.- Se agitan suavemente los tubos que resultarán positivos; se resiembran 2-3 asadas del contenido de cada uno a un tubo que contenga el medio de cultivo de la prueba confirmatoria. Al efectuar esta resiembra debe sostenerse el tubo primario (prueba presuntiva) en un ángulo tal que se pueda tomar la asada evitando la película que existiera en el medio.
- 2.- Se incuban los tubos por 48 horas a 35°C. Se considera la prueba positiva si hay formación de gas en cualquier cantidad, vire del indicador

y/o desarrollo bacteriano (enturbiamiento).

3.- Conociendo el número de tubos positivos y negativos de cada dilución, se determina el número más probable de organismos presentes en la muestra, tomando en cuenta que el empleo de las tres primeras diluciones a partir de la dilución 1:10 (3 tubos con 1 ml de la tercera dilución, 3 tubos con 1 ml de la segunda dilución y 3 tubos con 1 ml de la primera dilución) permite obtener a través de los valores de la tabla correspondiente directamente el número de microorganismos por gramo de muestra.

TABLA No. I

NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS

Tubos inoculados: 3 con 1 ml dilución 1:10 0.1 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 0.01 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1000 0.001 g muestra

<u>Tubos Positivos</u> NMP/g			<u>Tubos Positivos</u> NMP/g				
3	3	3	3	3	3		
(0.1)	(0.01)	(0.001)	(0.1)	(0.01)	(0.001)		
0	0	0	3.0	1	0	0	3.6
0	0	1	3.0	1	0	1	7.2
0	0	2	6.0	1	0	2	11.0
0	0	3	9.0	1	0	3	15.0
0	1	0	3.0	1	1	0	7.3
0	1	1	6.1	1	1	1	11.0
0	1	2	9.2	1	1	2	15.0
0	1	3	12.0	1	1	3	19.0
0	2	0	6.2	1	2	0	11.0
0	2	1	9.3	1	2	1	15.0
0	2	2	12.0	1	2	2	20.0
0	2	3	16.0	1	2	3	24.0
0	3	0	9.4	1	3	0	16.0
0	3	1	13.0	1	3	1	20.0

Continua TABLA No. I

Tubos Positivos			NMP/g	Tubos Positivos			NMP/g
3	3	3		3	3	3	
(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)	
0	3	2	16.0	1	3	2	24.0
0	3	3	19.0	1	3	3	29.0
2	0	0	9.1	3	0	0	23.0
2	0	1	14.0	3	0	1	39.0
2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
1	0	3	26.0	3	0	3	95.0
2	1	0	15.0	3	1	0	43.0
2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
2	1	2	27.0	3	1	2	120.0
2	1	3	34.0	3	1	3	160.0
2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
2	3	1	36.0	3	3	1	460.0
2	3	2	44.0	3	3	2	1100.0
2	3	3	53.0	3	3	3	31100.0

TABLA No. 2

NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS

Tubos inoculados: 3 con 10 ml de la muestra
 3 con 1 ml de la muestra
 3 con 0.1 ml de la muestra

No. Tubos positivos			NMP/100 ml	Límites de confianza (95%)	
3 (10 ml)	3 (1 ml)	3 (0.1 ml)		Mínimo	Máximo
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1.0	21
1	1	0	7	1.0	23
1	1	1	11	3.0	36
1	2	0	11	3.0	36
2	0	0	9	1.0	36
2	0	1	14	3.0	37
2	1	0	15	3.0	44
2	1	1	20	7.0	89
2	2	0	21	4.0	47
2	2	1	28	10.0	150
3	0	0	23	4.0	120
3	0	1	39	7.0	130
3	0	2	64	15.0	380
3	1	0	43	7.0	210
3	1	3	75	14.0	230
3	1	2	120	30.0	380
3	2	0	93	15.0	380
3	2	1	150	30.0	440
3	2	2	210	35.0	470
3	3	0	240	36.0	1300
3	3	1	460	71.0	2400
3	3	2	1100	150.0	4800

TECNICA DE FILTRACION A TRAVES DE MEMBRANA

Esta técnica se utiliza principalmente cuando se quiere nulificar la acción de conservadores y antibióticos (solubles en medio acuoso), al pasar la muestra a través de la membrana, sólo quedará en ella el contenido de microorganismos existentes, sin la acción bacteriostática o bactericida de las sustancias antes mencionadas y que darían un resultado falso negativo. A continuación se describe el procedimiento para formas farmacéuticas sólidas y líquidas orales no estériles.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Transferir asépticamente 10 gramos si la muestra es sólida, o bien 10 ml en caso de ser productos líquidos a un frasco estéril adicionar 90 ml de solución estéril de peptona al 1% y agitar por 5 minutos, la solución o suspensión de peptona obtenida corresponde a una dilución 1:10 preparar de esta solución dos soluciones más con una concentración de 1:100 y otra de 1:1000.
- 2.- Mezclar y filtrar cada solución, por separado, por medio de un sistema de filtración con membrana de 0.45 micras previamente esterilizado.
- 3.- Enjuagar los filtros con dos lavados de 100 ml, cada uno, de solución de peptona al 1% estéril.
- 4.- Sacar las membranas de los sistemas de filtración con pinzas estériles, cortarlas a la mitad con tijeras estériles y colocar una mitad de ellas en una caja petri que contiene medio de agar de soya tripticase, la otra mitad de la membrana colocarla en una caja petri que contiene medio de agar de dextrosa Sabouraud.
- 5.- Incubar las cajas con medio agar de soya tripticase a 30-35°C durante 48 horas al cabo de las cuales contar el número de bacterias. Incubar las cajas con medio agar dextrosa Sabouraud a 20-25°C durante siete días al termino de los cuales contar el número de hongos se toma el valor medio y se multiplica por el factor de dilución.

B. "DETERMINACION DEL TIPO DE MICROORGANISMO PATOGENO"

Los microorganismos patógenos considerados en este manual, como anteriormente se mencionó, por ser los que pueden encontrarse en las formas farmacéuticas no estériles son los siguientes: Salmonella, Escherichia coli, - Staphylococcus aureus y Pseudomona aeruginosa, los procedimientos para la identificación de ellos a continuación se describen.

IDENTIFICACION DE SALMONELLA Y ESCHERICHIA COLI

PROCEDIMIENTO:

- 1.-Pesar 10 gramos si la muestra es sólida o medir 10 ml si la muestra es líquida y depositarlos en 90 ml de caldo lactosado estéril, esto es la mezcla A.
- 2.-Incubar la mezcla A a 35°C durante 48 horas.
- 3.-Para la identificación de Salmonella.-Después de las 48 horas de incubación medir 1 ml de la mezcla A y depositarlo en un tubo que contiene 10 ml de caldo tetracionato. Agregar otro ml de la mezcla A a otro tubo que contenga 10 ml de medio selenito cistina.
- 4.-Mezclar e incubar ambos tubos a 35°C por un periodo de 24 horas.
- 5.-Después de este periodo de tiempo, se siembra con una asa de platino, de los tubos con caldo tetracionato y medio selenito cistina a cajas petri que contienen a los siguientes medios de cultivo:
 - 2 cajas petri con agar verde brillante
 - 2 cajas petri con agar xilosa lisina desoxicolato
 - 2 cajas petri con agar bismuto sulfito
- 6.-Incubar las cajas por un periodo de 24 a 48 horas a 35°C.
- 7.-Las colonias obtenidas sospechosas se siembran en tubos con agar hierro-tres azúcares por medio de picadura profunda. Incubar durante 24-48 horas.
- 8.-Después de este periodo observar los tubos; la formación de ácido (coloración amarilla) de la zona inoculada, con formación de gas y ennegrecimiento pero sin modificación de la superficie inclinada, es característica del genero Salmonella.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE SALMONELLA :

En agar verde brillante	Son colonias pequeñas transparentes incoloras u opacas de coloración rosada a blanca, en general rodeadas de una zona rosada a roja.
En agar xilosa lisina desoxicolato	Presentan colonias rojas con o sin centro negro.
En agar bismuto sulfito	Son colonias verdes o negras con brillo metálico.

IDENTIFICACION DE ESCHERICHIA COLI

PROCEDIMIENTO :

- 1.-Después de incubar la mezcla A (caldo lactosado más muestra) a 35°C durante 48 horas se siembra por medio de estria con la ayuda de una asa de platino sobre agar de Mac Conkey.
- 2.-Incubar por 24 horas a 35°C.
- 3.-Observar si hay desarrollo de colonias.
- 4.-Las colonias de color rojo ladrillo eventualmente con zonas de precipitado, son características de los colibacilos.
- 4.-Si el cuadro de colonias no es claro, se transplanta sobre agar eosina azul de metileno y se incuba de 24 a 48 horas a 35°C.
- 5.-Las colonias de Escherichia coli se caracterizan por dar color negro - azulado al trasluz y brillo metálico a la luz incidente.

IDENTIFICACION DE ESTAFILOCOCOS Y PSEUDOMONAS

PROCEDIMIENTO :

- 1.-Se pesan 10 gramos de la muestra si es sólida o se miden 10 ml de la muestra si es líquida y se depositan en 90 ml de caldo de Soya tripticase.
- 2.-Incubar de 24-48 horas a 35°C.
- 3.-Transplantar sobre agar Vogel y Johnson medio selectivo para Staphylococcus aureus. Transplantar también sobre agar cetrimida medio selectivo para Pseudomona aeruginosa.

- 4.-Incubar ambos medios durante un periodo de 24-48 horas a 35°C.
- 5.-Después de la incubación observar si hay desarrollo bacteriano. En caso de haber desarrollo sobre el agar de Vogel y Johnson de colonias negras con zonas amarillas características de *Staphylococcus aureus* se aplica el ensayo de la coagulasa. En este ensayo se inoculan tubos que contienen 0.5 ml de plasma sanguíneo de conejo. Incubar 24 horas a 37°C. Reportar positiva la prueba si hay formación de coágulo.
- 6.-Si hay desarrollo de colonias verdosas fluorescentes características de *Pseudomona aeruginosa* sobre el agar de Cetrimida, se emplea el ensayo de la oxidasa aplicando tiras de ensayo de papel de filtro. Estas tiras de ensayo se impregnan, antes de su uso con solución de N,N-dimetil-p-fenilendiamonio dicloruro. La aparición de un color rosado a púrpura indica la presencia de *Pseudomona aeruginosa*.

FORMAS FARMACEUTICAS QUE REQUIEREN CONTROLES MICROBIOLÓGICOS

2a. PARTE

FORMAS FARMACEUTICAS ESTERILES

Todo medicamento destinado para fines parenterales, por ejemplo; liofilizados, soluciones, suspensiones y soluciones de gran volumen deben cumplir con los siguientes controles microbiológicos:

- 1) Debe ser estéril, es decir, estar exento de cualquier microorganismo vivo
- 2) No debe tener pirógenos, es decir, debe estar libre de toxinas bacterianas.

1) La esterilización tiene como fin la destrucción o eliminación completa de todos los gérmenes y sus formas resistentes, sin alterar la actividad terapéutica, de manera que después de haber terminado el tratamiento adecuado, ya no deben encontrarse ni microorganismos capaces de reproducirse ni esporas en la solución.

El método para obtener la esterilidad en una forma farmacéutica esta determinado principalmente por su naturaleza. La preparación de formas farmacéuticas estériles requiere un conocimiento íntimo del equipo que se emplea y de la estabilidad del producto que se procesa. El proceso requiere una supervisión estricta del equipo y del procedimiento por personal bien entrenado en idear y aplicar métodos para lograr la esterilidad, además de pruebas adecuadas de la eficacia de las técnicas usadas.

Se deben de tomar en cuenta ciertas consideraciones previas al desarrollo de las pruebas de esterilidad, ya que éstas se deben realizar bajo condiciones asépticas para evitar la contaminación con otros microorganismos. Durante la prueba no deberán actuar agentes destructores de gérmenes sobre el material de ensayo como son: luz ultravioleta, aerosoles y agentes desin-

fectantes. Según el material a examinar el método de ensayo deberá elegirse, para evitar una eventual acción inhibitoria de parte de dicho material y no obtener un crecimiento óptimo de los microorganismos que estuvieren presentes.

Las pruebas de esterilidad deberán realizarse en cuartos estériles especialmente equipados para este propósito. Estas áreas se deben de controlar periodicamente en el contenido de gérmenes del aire, aplicando el método de placas con agar. Si el contenido de gérmenes del aire de las áreas sobre pasa al permitido, las áreas deberán esterilizarse utilizando sustancias químicas germicidas, bacteriostáticas y bactericidas como por ejemplo; yodo, formol, oxiclór, cloruro de benzalconio, etc., los restos de éstos desinfectantes deberán eliminarse antes de iniciar el trabajo con ayuda de agentes de neutralización (por ejemplo; amoniaco) o haciendo entrar aire filtrado bajo condiciones estériles, para mantener bajo el contenido de gérmenes en estas áreas conviene la irradiación con luz ultravioleta, además debe realizarse por medio de un programa de sanitización una limpieza intensa del suelo, mesas, paredes y techos así como de los utensilios de trabajo y aplicación de soluciones desinfectantes como ya se indico.

Antes de comenzar las pruebas de esterilidad, el personal que entra al área de pruebas debe lavarse las manos minuciosamente con jabón y cepillo, secarse con ayuda de aire filtrado y posteriormente desinfectarse con alcohol de 70-80% o bien con alcohol isopropílico.

MUESTREO: Para los productos que se esterilizan con vapor a presión en sus recipientes finales sellados, se muestrean para la prueba 10 o más unidades de cada carga del esterilizador. Es imperativo que estas muestras sean representativas de todas las capas de la carga.

Para otros productos contenidos en frascos ampula se muestrea para la prueba un total de 20 unidades que sean representativas de cada lote. En el caso de productos llenados asépticamente, se seleccionan las unidades a intervalos regulares durante cada operación de llenado. El término "operación de llenado" se refiere a cualquier periodo durante el cual no haya cambio en las llenadoras o en el equipo, y que no sea mayor que un turno o día de trabajo.

APERTURA DE LOS RECIPIENTES: Se limpian las superficies exteriores de las ampollitas y los cierres de los frascos-ampula con un agente bactericida adecuado. Se abren las ampollitas con una lima esterilizada. Si el contenido de los frascos-ampula se ha envasado al vacío, admítase en ellos aire estéril por medio de equipo estéril adecuado, tal como una aguja estéril unida a una jeringa llena de algodón no absorbente también estéril.

MEDIOS DE CULTIVO: Los medios recomendados para la prueba de esterilidad son los siguientes: Medio fluido de Tioglicolato y Medio caldo de Soya triplicase, el primero es para la investigación de microorganismos anaerobios, el segundo medio es para la investigación de microorganismos mesofílicos - aerobios.

Antes de emplear los medios de cultivo deberán ser controlados en cuanto a su efectiva funcionalidad, siendo los controles a realizar los siguientes:

a) Control de ausencia de microorganismos, es decir, los medios de cultivo no inoculados deberán permanecer libres de crecimiento de microorganismos en la incubación previa, en caso contrario la esterilización no ha sido suficiente.

b) Control del poder nutriente, es decir, los medios de cultivo inoculados deberán presentar, luego de incubados crecimiento microbiano óptimo. Para el control se emplea una cantidad de 1.0 ml de un cultivo que contiene a-

proximadamente 100 células y que tiene 24 horas de existencia de:

MEDIO	ORGANISMO DE PRUEBA	TEMP. INCUBACION
Fluido de Tioglicolato	1) Bacillus subtilis	30-35°C
	2) Cándida albicans	"
	3) Bacteroides vulgatus	"
Caldo de Soya tripticase	1) Bacillus subtilis	20-25°C
	2) Cándida albicans	"

La prueba se considera satisfactoria si dentro de los 7 días de incubación se observa crecimiento. En caso de que estos dos controles resulten satisfactorios, el medio de cultivo podrá ser utilizado.

BACTERIOSTASIS Y FUNGISTASIS.-Para determinar el nivel bacteriostático o fungistático de una sustancia o de un medicamento se inocula la cantidad especificada de muestra en el volumen indicado de medio, de acuerdo con la siguiente tabla:

VOLUMEN EN EL ENVASE	VOLUMEN MINIMO DE LA MUESTRA	VOLUMEN MINIMO DE MEDIO
10 ml o menos	1 ml del contenido	15 ml
De 10 a 50 ml	5 ml	40 ml
Más de 50 ml	10 ml	80 ml

Se inocula la mezcla (medio de cultivo más muestra) y un medio de cultivo como control con cultivos diluidos de bacterias u hongos que se sabe son sensibles al producto que se está probando y se incuba a 35°C durante siete días. Si el crecimiento obtenido es comparable en las muestras problema y control usar las cantidades especificadas en la tabla anterior para pruebas sucesivas. Si el crecimiento no es satisfactorio en el problema con relación al control, la muestra se considera bactericida o fungistática, - por lo tanto, tendrá que usarse el agente inactivante apropiado. Si no existiera tal inactivante, determinar la dilución apropiada de la muestra utilizando las cantidades especificadas y cantidades mayores de medio de cultivo, en la cual el crecimiento del microorganismo no sea afectado. Esta tabla es

válida para seleccionar la alícuota representativa de la muestra dependiendo de su volumen total y la cantidad de medio que se debe emplear para la inoculación, con el fin de evitar una excesiva dilución del medio de cultivo y por lo tanto de los nutrientes, obteniéndose así resultados negativos.

Es necesario considerar la presencia de aditivos o coadyuvantes que puedan tener una acción inhibitoria sobre los microorganismos y que requieren dilución o inactivación, la actividad inhibitoria se puede eliminar agregando un inactivador apropiado.

Inhibidores

Penicilina

Estreptomycin

Compuestos de mercurio y otros metales pesados

Sulfonamidas

Compuestos de amonio cuaternario.

Compuestos de arsénico

Inactivadores

Penicilinas, cloruro de hidroxilammonio.

Cisteína, cloruro de hidroxilammonio, penicilinas.

Compuestos con SH (tioglicolato al 0.5%, cisteína, glutatión, dimercaptol).

Acido p-aminobenzoico.

Lecitina, Tween 80, éster polioxetilénico.

Tioglicolato (concentración superior al 0.5%), cisteína.

La anulación del efecto inhibitor se comprueba mediante el ensayo paralelo sembrando en medios de cultivo conteniendo material de prueba y en medios de cultivo sin material de prueba, una cantidad mínima de gérmenes sensibles. La elección de cada germen se orienta según el inhibidor.

Inhibidores

Control general

Penicilina

Estreptomycin

Compuestos de mercurio

Sulfonamidas

Compuestos de arsénico

Organismos de ensayo aerobios

Staphylococcus aureus o E. coli

Staphylococcus aureus

Escherichia coli o B. subtilis

Staphylococcus aureus o E. coli

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

METODOS PARA EFECTUAR LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD

Existen 2 métodos para efectuar las pruebas de esterilidad siendo estos: El método Directo y el método de Filtración por membrana, la elección del método depende de la solubilidad en sistemas acuosos del producto. Cuando se tiene un producto insoluble se elige el primer método.

METODO DIRECTO

En el método directo se inoculan los productos a los medios de cultivo sin ningún recurso o acción intermedia. Los medios sembrados en medio fluido de Tioglicolato se incuban a 35°C y los de Soya tripticaseína se incuban a 20-25°C.

Resiembras o subcultivos.- Ciertos productos enturbian el medio dificultando la observación de cualquier desarrollo microbiano, por lo que es necesario hacer subcultivos de la siguiente manera; después de 3 a 5 días de incubación, transferir 1 ml de cada tubo a otros que contengan 20 ml de cada medio.

Continuar la incubación de los tubos originales y de los resemebrados por un periodo de 14 días.

INTERPRETACION DE LA PRUEBA.- El desarrollo microbiano se manifiesta por turbiedad en los medios de cultivo, si no hay evidencia de lo anterior el ensayo es negativo y por lo tanto el producto analizado, satisface las especificaciones de las pruebas de esterilidad. Si el ensayo es positivo, el análisis se repite con el doble de muestras probadas.

METODO DE FILTRACION POR MEMBRANA

La filtración a través de membrana de las muestras sometidas a pruebas de esterilidad es un método valioso, sin embargo, las manipulaciones adicionales requeridas para esta variante pueden ser fuente de contaminación

extraña, por lo que es aconsejable la inclusión de controles positivos y negativos cada vez que se realiza la prueba.

Como filtros de membrana la farmacopea nacional de los Estados Unidos de Norteamérica edición XXI recomienda a aquellos con diámetro de porosidad 0.45 micras, diámetro aproximado de 47 mm y que presenten una velocidad de flujo de 55 a 75 ml/min, bajo una presión de 70 cm de mercurio. El aparato de filtración armado se esteriliza en autoclave, o bien empleando gases destructores de gérmenes (óxido de etileno u óxido de propileno), o se puede armar bajo condiciones asépticas las distintas partes una vez que se han esterilizado previamente.

Tamaño de la muestra.- Muestra representativa para productos inyectables en frascos ampulas o en ampollitas 20 unidades.

PROCEDIMIENTO GENERAL

- 1.-Previa desinfección de los frascos extraer el contenido de cada frasco o de cada ampollita con jeringa o pipeta estéril y depositarla en un matraz con 100 ml de agua peptonada al 1% esterilizada.
- 2.-Recolectar el contenido de la muestra en el vaso del equipo y filtrar con ayuda de vacío. Lavar tres veces con volúmenes de 100 ml de agua peptonada al 1% esterilizada.
- 3.-Una vez terminado lo anterior se desmonta el embudo de filtración y con ayuda de una pinza y tijeras estériles, se corta la membrana en 2 mitades.
- 4.-Una mitad depositarla en un tubo que contiene medio fluido de Tioglicolato e incubar a 30^o-35^oC por 7 días.
- 5.-La otra mitad depositarla en otro tubo que contiene caldo de Soya tripticaseína e incubar a 20^o-25^oC por 10 días.
- 6.-Durante el periodo de incubación se observan diariamente los tubos para cerciorarse que no hay contaminación.
- 7.-Lectura final a los 7 y 10 días.-No debe de haber desarrollo en los tubos de Tioglicolato ni en los de caldo de Soya tripticaseína.

8.- En caso de existir desarrollo en cualquiera de los tubos, la prueba se considera positiva y habrá de repetirse con el doble de muestras probadas, de los tubos contaminados hacer tinciones para determinar el tipo de contaminación.

9.- Si al término de los 7 días y 10 días periodo de incubación no se observa contaminación, la muestra satisface los requerimientos para la prueba de esterilidad.

Controles o testigos de la prueba

Control de pipetas.- La primera pipeta que se saca de cada portapipetas, sirve de testigo de su esterilización introduciéndola en medio de Tioglicolato, llevar este hasta $2/3$ de su capacidad, expulsando nuevamente el líquido en el tubo, repetir la misma operación con otra pipeta, pero ahora con el medio de Soya tripticaseína, los tubos se incuban junto con los tubos de la prueba de ese día.

Control de operación.-Esta prueba se hace con el fin de controlar la técnica que ha seguido el operador y las condiciones del ambiente en que se realiza, puede hacerse con viales que contengan medio de cultivo o con ampollitas conteniendo agua estéril, manejándose exactamente igual que si se tratara de un producto farmacéutico.

Contaminación del ambiente.-Se exponen placas con medio de agar de Soya tripticaseína y placas con medio agar de dextrosa Sabouraud, para conocer el grado de contaminación que existe en el área donde se efectúan las pruebas de esterilidad. La exposición de estas placas debe ser diariamente por 30 minutos.

Control de esterilización en autoclave.- Las autoclaves y esterilizadores grandes y más modernos vienen equipados generalmente con termómetros registradores y controles automáticos completos. Propiamente instalado y usado, este termómetro representa un indicador fiel del curso de la esterilización, indica el tiempo cuando una carga determinada ha llegado a su temperatura de

esterilización, cuánto tiempo ha permanecido en ella y cuánto tiempo transcurrió hasta poder descargar el esterilizador.

Por otra parte las autoclaves o esterilizadores normales o chicos no llevan este dispositivo y todo lo que hace el operador es apagar el aparato - después de haberse terminado el tiempo necesario de esterilización. El manómetro de presión no siempre es una garantía de que se haya esterilizado correctamente una carga, aunque el operador haya vigilado constantemente la presión. Y además, es imposible comprobar si el calor ha llegado a todos los puntos de la carga, aún teniéndose manómetros, registradores u otros equipos similares.

Para controlar el trabajo efectivo de las autoclaves de laboratorio, es decir, para rectificar si la temperatura de esterilización requerida ha sido correcta y que el vapor ha podido actuar realmente sobre todo el material expuesto se cuentan con "testigos de esterilización" como indicadores físicos, tiras indicadoras y bioindicadores que se colocan dentro del esterilizador, de preferencia repartidos en diferentes lugares. El punto menos caliente de un esterilizador, por ejemplo, será el lugar por donde queda el escape del vapor. Otra posición sería en el centro del material a esterilizar.

Las tiras o cintas indicadoras están hechas de papel grueso, impresos con ciertos colorantes como indicadores, los cuales cambian su color de acuerdo con el tiempo, la temperatura (o presión), la humedad relativa y en ausencia de aire. Si uno de estos factores no está de acuerdo con las especificaciones, se producen los siguientes resultados:

- 20 minutos a 100 °C reacción ligera - tono beige
- 20 minutos a 110 °C reacción definida - tono café
- 20 minutos a 120 °C reacción intensa - tono negro

Los bioindicadores se presentan en ampollitas que contienen suspensiones de esporas de *Bacillus Stearothermophilus* en un medio de cultivo selectivo. La población de esporas se ha estandarizado de suerte que las esporas sobreviven cuando se someten a 121°C en el autoclave durante 5 minutos, y mueren

cuando se someten a 121°C en el autoclave durante 15 minutos. Cuando la exposición en autoclave a una temperatura más baja o durante menos tiempo, - tendrá lugar el desarrollo, indicando una esterilización incompleta, el indicador utilizado en este medio es púrpura de bromocresol el cual cambia por la producción de ácido durante el tiempo de esterilización, de púrpura a - color amarillo facilitando así la observación del desarrollo.

Procedimiento: Las ampollitas del bioindicador se colocan junto al material que va a ser esterilizado.

Después del tratamiento en autoclave, se incuban las ampollitas a 55°C por 24-48 horas, si la esterilización fue completa, no se detecta crecimiento de *Bacillus Stearothermophilus*, permaneciendo el color púrpura del medio. Si la esterilización no fué completa el bacilo presenta crecimiento observándose el contenido de las ampollitas amarillo y turbio.

V

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIOS DE CULTIVO

La calidad de los ensayos microbiológicos en el análisis de las formas farmacéuticas, esta directamente relacionada con la idoneidad de los medios de cultivo, así como de los reactivos que se utilizan en el análisis, tanto de la materia prima como del producto terminado; podemos considerar que las mejores instalaciones y equipo disponibles, así como la habilidad del microbiólogo pierden su valor si la composición y preparación de los medios de cultivo y reactivos no corresponden a la requerida.

La calidad indeseable de un medio de cultivo puede estar determinada por varios factores como son: error en el peso o medición de los ingredientes, uso de medios de cultivo preparados varios días antes de ser utilizados, lo cual ocasiona pérdida de agua, concentración de los ingredientes o bien pueden también presentarse degradaciones, oxidaciones o reducciones de los mismos.

La deficiencia en el ajuste de pH, la presencia de sustancias inhibitorias en concentraciones inadecuadas, el exceso de humedad en la superficie de los medios sólidos, el sobrecalentamiento de los medios durante su preparación y/o esterilización, el uso de medios de cultivo deshidratados viejos, las temperaturas y/o períodos de esterilización inadecuados, constituyen factores importantes que debemos de tomar muy en cuenta porque van a influir en la calidad de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en el análisis de las formas farmacéuticas son de varios tipos:

- 1) De Preenriquecimiento
- 2) Enriquecimiento
- 3) Simples

- 4) Enriquecidos
- 5) Selectivos y diferenciales
- 6) Indicadores

MEDIOS DE PREENRIQUECIMIENTO.-El uso de éstos, tienen como objetivo reactivar y permitir la multiplicación de microorganismos presentes en productos que han sido sometidos a proceso que de alguna manera afectan la viabilidad de los mismos.

La preparación de éstos medios es sencilla, como ejemplos tenemos: Caldo lactosado, agua peptonada ambos de gran utilidad en la investigación de enterobacterias patógenas.

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO.-Su empleo favorece la multiplicación de un grupo género o especie en particular de microorganismos. Estos medios están adicionados de sustancias bacteriostáticas a concentraciones tales que no afectan al microorganismo que interesa, pero que a su vez inhiben el grupo o microorganismo indeseable, ejemplo de ellos es caldo Selenito y caldo Tetratona de gran utilidad en la búsqueda de Salmonella, el caldo de soya con cloruro de sodio a alta concentración es de gran importancia en la investigación de Staphylococcus aureus.

MEDIOS DE CULTIVO SIMPLES.- Se usan para el aislamiento, conservación y determinación del número de organismos mesofílicos aerobios, ejemplo; caldo nutritivo.

MEDIOS ENRIQUECIDOS.- Su preparación requiere el uso de medios simples como base, más la adición de uno o varios componentes ricos en nutrientes, tales como la sangre, leche, extractos de vegetales, etc., por ejemplo; la gelosa sangre.

MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.- Estos medios son sólidos y permiten la obtención de colonias de algunos microorganismos que presentan un aspecto característico (efecto diferencial) y que tienen además la capacidad de inhibir (efecto selectivo) la flora asociada no deseada, por ejemplo; agar eosina azul de metileno, agar Salmonella Shigella (SS) o agar xelosa lisina, agar sulfito bismuto útil en el aislamiento de Salmonella.

MEDIOS DE CULTIVO INDICADORES.- Su preparación incluye un medio base simple o enriquecido, adicionado de alguna sustancia o sistema que permita poner de manifiesto un cambio o la generación de alguna o varias sustancias características de la fisiología del microorganismo, por ejemplo; caldo lactosado para determinar si el microorganismo de prueba fermenta o no el azúcar, medio de Kligler que permite demostrar si el crecimiento produce H_2S y si fermenta la glucosa y/o la lactosa, medio de SIM para determinar producción de H_2S , Indcl, etc.

APLICACIONES Y PROPIEDADES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:

Agar y caldo de Soya trinticaséina.-Estos medios de cultivo son medios universales, libres de inhibidores e indicador y previstos para un amplio espectro de aplicaciones, bajo condiciones anaerobias se pueden desarrollar microorganismos obligada o facultativamente anaerobios así como microaerófilos. El caldo de Soya tripticaseína se emplea en las pruebas de esterilidad, el agar de Soya tripticaseína se emplea en la determinación del número de microorganismos.

Agar de dextrosa Sabouraud.-Es empleado para aislar e identificar hongos patógenos de la piel y en la determinación del número de microorganismos (límite microbiano de hongos).

Medio fluido de Tioglicolato.-Este medio de cultivo semisólido que se emplea en capa vertical o columna, sirve para aislar microorganismos anaerobios obligados y facultativos así como microaerófilos. Debido a su composición en sustancias nutritivas altamente reductoras, el tioglicolato y la cistina, el medio recién preparado posee una anaerobiosis suficiente para anaerobios exigentes. Una elevación eventual del contenido de oxígeno se indica por el viraje del indicador redox resazurina sódica a rojo.

Para mantener el medio anaerobio, luego de inocular con el material en examen, durante una incubación prolongada, la superficie del medio se puede cubrir con una capa de aproximadamente 1 cm de espesor de parafina esterilizada o agar nutritivo, el medio fluido de Tioglicolato se emplea en las pruebas de esterilidad y puede usarse también para el cultivo de anaerobios patógenos en el diagnóstico bacteriológico.

Composición	(g/litro)
Peptona de caseína	15.0
L (+)-Cisteína	0.5
D (+)-Glucosa	5.5
Extracto de levadura	5.0
Tioglicolato de sodio	0.5
Cloruro de sodio	2.5
Resazurina de sodio	0.001
Agar-agar	0.75

Es de mencionarse que el almacenamiento del medio de cultivo a temperatura ambiente y en la oscuridad aumenta su estabilidad, el medio no puede emplearse ya cuando más del tercio superior de la capa vertical o columna se ha coloreado de rojo. Si la coloración puede eliminarse calentando una vez hasta ebullición el medio puede seguirse usando.

Caldo lactosado.-Se emplea para el examen de presencia de bacterias coliformes y para comprobación de la degradación de la lactosa por las bacterias, la identificación se basa en la formación de gases durante la degradación de la lactosa. En el caldo lactosado se coloca un tubo de Durham (puede -

usarse también una ampollita abierta invertida), en el cual se captura el gas desprendido en forma de una burbuja.

Medio de cultivo de enriquecimiento tetracionato (base).--Sirve para el enriquecimiento selectivo de las especies de Salmonella en el examen de preparados farmacéuticos o de materias primas utilizadas en la elaboración de éstos.

Todas las bacterias reductoras de tetracionato, como por ejemplo Salmonella, pueden desarrollarse bien en este medio, mientras que son inhibidos por la presencia de verde brillante todos los gérmenes grampositivos. Y por la presencia de las sales biliares son inhibidos todos los microorganismos que no viven en el intestino. El tetracionato se obtiene durante su preparación, ya que se forma por oxidación del tiosulfato de sodio presente por el agregado posterior de yodo; como los tetracionatos son muy sensibles al calor y se descomponen con facilidad en ácido sulfúrico, ácido sulfuroso y azufre, este método tiene la ventaja de que el medio de cultivo se puede esterilizar al calor antes de agregarle la solución de yodo. Luego deberá evitarse todo calentamiento. Los productos de descomposición del tetracionato que pueden formarse eventualmente, se neutralizan con el carbonato de calcio presente.

Composición	(g/litro)
Peptona de caseína	2.5
Peptona de carne	2.5
Mezcla de sales biliares	1.0
Carbonato de calcio	10.0
Tiosulfato de sodio	30.0

Una vez esterilizado y frío se agregan 20 ml de una solución de yodo-yodurado de potasio y 10 ml de una solución al 0.1% de verde brillante y se mezcla agitando.

Preparación de la solución de yodo-yoduro de potasio:

Yodo	6 g
Yoduro de Potasio	5 g
Agua destilada	20 ml

Medio de cultivo de enriquecimiento selenito-cistina.- El selenito contenido en el medio de cultivo inhibe el crecimiento de las bacterias coliformes y de los enterococos en las primeras 12 horas de incubación; después la acción inhibidora decrece paulatinamente en cambio pueden crecer sin interferencias *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* y *Pyocyanus*.

Composición	(g/litro)
Peptona de caseína	5.0
L (-) - Cistina	0.01
D (+) - Lactosa	4.0
Fosfato de sodio dibásico	10.0
Selenito de sodio	4.0

Agar verde brillante.- Este medio de cultivo esta previsto para ensayos paralelos con otros medios de cultivo selectivos menos inhibidores, como el agar xilosa lisina desoxicolato y el agar bismuto sulfito, para aislar las especies de *Salmonella* en materias primas que se emplean en la elaboración de preparados farmacéuticos.

El medio de cultivo, presente, contiene como cuerpo de reacción lactosa y sacarosa, cuya degradación a ácidos se indica mediante el indicador de pH rojo de fenol. Como inhibidor selectivo, sirve una concentración elevada de verde brillante, que inhibe en alto grado todos los microorganismos grampositivos.

Composición	(g/litro)
Peptona de caseína	5.0
Peptona de carne, péptica	5.0
Extracto de levadura	3.0
D (+)- Lactosa	10.0
D (+)- Sacarosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.08
Verde brillante	0.0125
Agar-agar	13.0

Agar-xilosa-lisina-desoxicolato.- Este medio selectivo se emplea para aislar bacterias enteropatógenas, como Shigella y Salmonella.

El agar xilosa lisina desoxicolato permite realizar las siguientes reacciones de diferenciación; la degradación de los azúcares xilosa, lactosa y sacarosa a ácido, se indica con ayuda del indicador de pH rojo de fenol, mediante el cambio del color original a amarillo, el tiosulfato sirve como cuerpo de reacción, y la sal de hierro (III) como indicador de la formación de sulfuro de hidrógeno, la cual se hace visible por la precipitación de sulfuro de hierro negro en las colonias. Las bacterias capaces de descarboxilar la lisina a la amina cadaverina se reconocen por la aparición de un color rojo púrpura en torno de las colonias a consecuencia de un aumento del pH.

Composición	(g/litro)
D (+)-Xilosa	3.5
L (+)-Lisina	5.0
D (+)-Lactosa	7.5
D (+)-Sacarosa	7.5
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	3.0
Desoxicolato de sodio	2.5
Tiosulfato de sodio	6.8
Citrato de amonio y hierro (III)	0.8
Rojo de fenol	0.08
Agar-agar	13.5

Agar bismuto sulfito.-Este medio de cultivo selectivo sirve principalmente para aislar e identificar bacterias de tifus en heces, aguas residuales, alimentos y otros, la mayoría de las demás Salmonelas pueden también ser reconocidas utilizando este medio de cultivo.

La acción selectiva del medio se debe al elevado porcentaje de verde brillante, el cual inhibe el crecimiento de toda la flora acompañante grampositiva, así como de Proteus y de las bacterias coliformes.

La capacidad de diferenciación se basa en el siguiente mecanismo; el -

contenido de sales de hierro y bismuto del medio de cultivo permite la identificación de los microorganismos que forman sulfuro de hidrógeno, debido al ennegrecimiento producido por la precipitación de sulfuro, la diferenciación de los formadores de sulfuro así reconocidos, es posible por la variedad de sus sulfuros. Mientras que un grupo de Salmonella precipita una mezcla amorfa de sulfuro de hierro y de bismuto, el otro da un precipitado de sulfuro de bismuto cristalizado de brillo metálico.

Composición	(g/litro)
Extracto de carne	5.0
Peptona	10.0
D (+)-Glucosa	5.0
Sulfato de hierro (II)	0.3
Fosfato de sodio dibásico	4.0
Verde brillante	0.025
Indicador bismuto-sulfito	8.0
Agar-agar	15.0

Nota: El medio de cultivo opaco deberá poseer una coloración pálida a verdosa, si presenta coloración parda el medio no debe ser utilizado.

Agar hierro tres azúcares.-Este medio fué propuesto para diferenciar bacterias intestinales gramnegativas, teniendo en cuenta la facultad de las mismas de degradar la glucosa, lactosa y sacarosa a ácido o a ácido y gas, formando el sulfuro de hidrógeno.

La degradación de azúcar con formación de ácido se indica por el cambio del indicador rojo de fenol de anaranjado a amarillo, una alcalinización por viraje a rojo intenso. Algunos microorganismos reducen tiosulfato a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con la sal de hierro (III) formando sulfuro de hierro negro. La degradación de glucosa a ácido es anaerobia y conduce a lo largo del canal de picadura a un viraje de color del indicador de rojo a amarillo (Salmonella y Shigella). La lactosa y la sacarosa, en cambio, se degradan bajo condiciones aerobias, es decir sobre la superficie inclinada lo que produce sobre la misma una coloración amarilla. Si se de-

gradan glucosa y lactosa, o glucosa y sacarosa, tanto la picadura como la superficie inclinada presentan un cambio de color a amarillo (Escherichia y Aerobacter). La formación de huecos y grietas en el medio de cultivo indica que se ha formado gas durante la degradación de azúcar.

Composición	(g/litro)
Extracto de carne	3.0
Extracto de levadura	3.0
Peptona de caseína	15.0
D (+)-Lactosa	10.0
Peptona de carne	5.0
D (+)-Sacarosa	10.0
D (+)-Glucosa	1.0
Citrato de amonio y hierro (III)	0.5
Cloruro de sodio	5.0
Tiosulfato de sodio	0.5
Rojo de fenol	0.024
Agar-agar	12.0

Nota:El color del medio para su empleo es rojo anaranjado.

Agar de Mac Conkey.- El agar selectivo según Mac Conkey sirve para aislar y diferenciar Salmonella y Shigella como también bacterias coliformes en heces, orina y otro material de examen.

La degradación de lactosa a ácido se indica por el cambio del indicador rojo neutro a rojo oscuro. Debido al contenido del medio de cultivo de sales biliares, se seleccionan las bacterias intestinales, mientras que la flora restante grampositiva se ve inhibida en su crecimiento por el cristal violeta.

Composición	(g/litro)
Peptona de caseína	17.0
Peptona de carne	3.0
D (+)-Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
Agar-agar	13.5

Agar eosina azul de metileno.- El agar selectivo recomendado originariamente por Levine (1918) sirve para el aislamiento y la diferenciación de *Escherichia coli* y *Enterobacter (Aerobacter) aerogenes*, para la identificación rápida de *Cándida albicans*, y para la identificación de los estafilococos coagulasa positivos. Todos los microorganismos grampositivos son inhibidos por el contenido de colorantes. Según Weld (1952), agregando al agar eosina azul de metileno agar hidrocioruro de clorotetraciclina, que inhibe toda la flora bacteriana, se puede utilizar el medio para una identificación rápida de *Cándida albicans* en material de examen clínico. La identificación se puede realizar en heces, secreciones orales o vaginales, uñas o raspado de piel, incubando a 37°C en una atmósfera de bióxido de carbono dentro de las 24 a 48 horas. Vogel y Moses (1957) han publicado resultados satisfactorios de la identificación de *Cándida albicans* en esputo.

Composición	(g/litro)
Pectona de carne, péptica	10.0
D (+)-Lactosa	10.0
Fosfato de potasio dibásico (anhidro)	2.0
Eosina amarilla	0.4
Azúl de metileno	0.067
Agar-agar	13.5

Para desarrollar *Cándida albicans* se agregan después de esterilizar y enfriar a 60°C aproximadamente 100 mg de hidrocioruro de clorotetraciclina y se mezcla en forma homogénea, formandose una coloración azul intensa. Luego se vierte en placas de petri esterilizadas, se incuban de 1 a 2 días a 37°C para obtener un desarrollo primario de *Cándida albicans* en un recipiente con 10% de bióxido de carbono.

Evaluación:	Colonias	Especies
	2-3 mm de diámetro, confluentes, brillo metálico verdoso a la luz reflejada, centro oscuro a negro a la luz transmitida.	<i>Escherichia coli</i>

Evaluación:	Colonias	Especies
	4-6 mm de diámetro, confluentes, centro pardo grisáceo a la luz transmitida, sin brillo metálico.	Enterobacter (Aerobacter) aerogenes.
	Forma de telaraña o de pluma	Cándida albicans
	Semejantes a levaduras, redondas, lisas	Otros tipos de Cándida.

Agar selectivo para estafilococos Vogel-Johnson.-Este agar selectivo es un medio de cultivo para la identificación precoz de estafilococos manita positivos, puesto que la capacidad de coagulación del plasma aparece casi siempre simultáneamente con la capacidad de fermentación de la manita, debido a esta última pueden aislarse los estafilococos patógenos. Los estafilococos se pueden seleccionar aún en material fuertemente contaminado - gracias a dos propiedades específicas; su tolerancia frente a concentraciones elevadas de cloruro de sodio y su poca sensibilidad frente a los agentes bacteriostáticos como son cloruro de litio y telurito, este último es reducido por algunos estafilococos a telurito metálico, lo que conduce a un ennegrecimiento de las colonias.

El medio de cultivo se aplica para exámenes bacteriológicos en gran escala de formas farmacéuticas, alimentos, aire, polvo, esputo, frotis de garganta y similares ya que es altamente específico, los microorganismos acompañantes indeseables son inhibidos prácticamente por completo en su desarrollo mediante el telurito y el cloruro de litio, mientras que una escasa inhibición eventual de los estafilococos se compensa por el alto contenido de glicocola.

Como cuerpo de reacción para la diferenciación, el medio contiene manita, la cual puede ser degradada a ácido por algunos estafilococos, este se comprueba mediante el indicador rojo de fenol que vira a amarillo formando una aureola alrededor de las colonias, otra característica es la reducción de telurito mencionada anteriormente.

Antes de utilizarlo se agregan, agitando, al medio de cultivo licuado y

enfriado a 50°C, 20 ml de una solución de telurito de potasio al 1%, esterilizada previamente. Luego se vierte el medio en placas petri esterilizadas.

Composición	(g/litro)
Peptona de caseína	10.0
Extracto de levadura	5.0
D (+)-Manita	10.0
Fosfato de potasio dibásico	5.0
Cloruro de litio	5.0
Glicocola	10.0
Rojo de fenol	0.025
Agar-agar	13.0

Agar selectivo para Pseudomonas-Agar Cetrimida.- El agar selectivo para Pseudomonas está previsto para aislar e identificar Pseudomonas aeruginosas (pseudomonas pyocyanea) en diversos procesos patológicos, como heridas de quemaduras, infecciones postoperatorias, septicemias, infecciones de las vías urinarias, infecciones por mordeduras, y otros.

El empleo del compuesto de amonio cuaternario bromuro de cetiltrimetilamonio como agente selectivo, sirve para la inhibición de microorganismos que no son idénticos a Pseudomona aeruginosa.

Composición	(g/litro)
Peptona de gelatina	20.0
Cloruro de magnesio	1.4
Sulfato de potasio	10.0
Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio	0.5
Agar-agar	13.6

Se agregan 10 ml de glicerina al medio antes de su esterilización.

Solución Reguladora de Fosfato pH 7.2:

Preparación de la solución Stock.- Se disuelven 34 g de fosfato de potasio monobásico en un matraz de 1000 ml con 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2±0.1 con la adición de Hidróxido de Sodio S.R. (aproximada-

mente 175 ml), agregar agua hasta el volumen y mezclar, esterilizar y guardar en el refrigerador.

Preparación de la solución a emplear.- Diluir la solución Stock con agua destilada a razón de 1:800 y esterilizar.

VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El control Microbiológico nos va a comprobar la calidad de Producción y garantizar ésta al consumidor, en cuanto a la no contaminación por organismos vivos en formas farmacéuticas estériles y en cuanto a una contaminación mínima permitible de microorganismos no patógenos en formas farmacéuticas no estériles.
- 2) Una óptima calidad de producción nos indicará que se ha supervisado y controlado debidamente las posibles fuentes de contaminación en la manufactura de formas farmacéuticas como son materias primas, medio ambiente, áreas de trabajo, equipo y personal.
- 3) Cada posible fuente de contaminación debe cumplir con un programa de control microbiológico para conocer el riesgo de contaminación hacia la forma farmacéutica.
- 4) La realización de manuales teóricos prácticos permitirán:
 - a) Implementar y verificar el cumplimiento de ellos en las rutinas de trabajo minimizando fallas y errores.
 - b) Inducción y adiestramiento al personal nuevo.
 - c) Aumentar la concientización del personal indicándoles lo que deben hacer y como deben hacerlo.
 - d) Facilitar la supervisión del trabajo.
 - e) Ayudar a la coordinación del trabajo y evitar duplicaciones.
 - f) Revisar y mejorar los sistemas, procedimientos y métodos para actualizarlos.
 - g) Reducir costos al aumentar la eficiencia y responsabilidades de todo el personal.

- 5) La aplicación práctica del presente trabajo en otras compañías, es válida adaptando éstos conceptos y conocimientos técnicos a las necesidades y medios con que cuenten para realizar su trabajo.
- 6) El buen funcionamiento de un manual dependerá de la cooperación de todas y cada una de las personas que tengan relación con él.

VII

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. The United States Pharmacopeia XXI
The National Formulary XVI
United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1985
2. British Pharmacopoeia 1980
London Her Majesty's Stationery Office.
3. Lacham Leon, Lieberman Herbert
"The Theory and practice of Industrial Pharmacy"
Second Edition 1976
Lea & Febiger Philadelphia
4. "Remington's Pharmaceutical Sciences"
16 th Edition 1980
Mack Publishing Company, Pennsylvania.
5. Burdon Kenneth L., Williams Robert P.
"Microbiología"
Ia. Reimpresión 1974
Publicaciones Cultural S.A. México.
6. Jawetz E., Melnick J.
"Manual de Microbiología Médica"
4a. Edición 1970
El Manual Moderno S.A. México
7. Seymour S. Block
"Desinfection, Sterilization and Preservation"
2nd Edition 1977
Lea & Febiger Philadelphia

8. Code of Federal Regulations
Food and Drugs 2I Parts 300 to 499
U.S. Government Printing Office.
Washington 1981

9. Official Methods of Analysis of the
Association of official Analytical Chemist
Editor William Horwitz
Thirteenth Editio 1980, Washington USA.

10. Rodriguez Devesa D., Navarro Medina A.
"Control de la calidad durante la fabricación de
productos farmacéuticos y cosméticos".
Ediciones Castilla, S.A. Madrid 1976

11. Hugo W.B., Russell A.D.
"Pharmaceutical Microbiology"
Second Edition
Blackwell Scientific Publications, Great Britain 1981.

12. Hopeman R.J.
"Producción, conceptos, análisis y control"
Compañía Editorial Continental, S.A. México 1973

13. Cooper M.S.
"Quality Control in the Pharmaceutical Industry"
Vol I Academic Press New York USA 1972

14. Wirth Lindemann Carlos Martin P.
"Inyectables y su control" Compañía Editorial Continental S.A. 1962

15. Lynch, Raphael, Mellor, Spore, Inwood
"Métodos de Laboratorio".
2a. Edición 1976
Interamericana, México.
16. Manual de Bacteriología Difco 1980
Gráficas Mirasa, S.L. Valdemoro Madrid
17. Specifications for the Quality Control
of Pharmaceutical Preparations
Second Edition of the International Pharmacopoeia
World Health Organization 1967, Geneva Bélgica.
18. Diagnostica Merck
"Control Microbiológico de Calidad de Productos
Farmacéuticos y Materias Primas" México 1970
19. Perez Miravete A.
Técnicas para el muestreo y análisis microbiológico
de alimentos de la Dirección General de Investiga-
ción en Salud Pública de la SSA, 1975
20. Pharmaceutical Codex
Eleventh Edition 1979
Pharmaceutical Press
21. Frieben W.R. "Controlling the Microbiological Quality
of Nonsterile Pharmaceuticals"
Pharmaceutical Manufacturing Vol. I, Núm. 10 Dic. 1984
22. Cardner R.Y. "Current concepts for the microbiological
control of nonsteriles drug products".
Pharm Tech. 7:54-55, 58 Jun 1983

23. Buogo A, Ratti L. "Methods for the microbiological control of nonsterile drugs".
Farmaco Ed. Prat. 27:523-531 Sept 1972.
24. Buhlmann X., Gay M., Hess H., Knusel F.
"Method for testing nonsterile pharmaceutical products based on microbial content"
Pharm. Acta Helv. 43:374-381 Jun 1968
25. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos
4a. Edición SSA México 1974
26. Tesis: Detección y Minimización de la contaminación Microbiológica en las formas farmacéuticas no estériles.
UNAM 1974
Buenrostro E.A., Lortia H.J., Marx R.L.
27. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM
31a. Edición Mexicana 1985.