



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Modificación de la técnica del número más probable en  
el análisis microbiológico de dos excipientes  
farmacéuticos**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

**P R E S E N T A:**

**JESÚS ENRIQUE VIZCAÍNO DORADO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA**

**ASESOR DE TESIS:**

**MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA**



**MÉXICO, D.F**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## **Agradecimientos**

*A mis padres:*

*Por su paciencia, su confianza y por guiarme en el camino; por sus consejos, pero sobre todo por otorgarme la herencia más valiosa que un padre le pueda dejar a sus hijos.*

*Al Doctor Luis y a la Maestra Yolanda, por permitirme desarrollar este proyecto bajo su asesoría y por el apoyo que me brindaron estos últimos meses.*

*A mi hermano:*

*Que más allá de su labor de amigo a lo largo de mi vida se ha vuelto ahora un ejemplo y ha sido un maestro en esta etapa que hoy concluyo.*

*A mis amigos, por brindarme algunos de los momentos más importantes de mi vida; que el viento los lleve lejos hasta alcanzar sus metas.*

*A Dios, por su más grande bendición, darme la oportunidad de ser y de hacer.*

Nada es demasiado maravilloso para  
ser cierto si obedece a las leyes de la  
Naturaleza.

- Michael Faraday -

## Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Contaminación microbiológica en la industria farmacéutica</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Fuentes de contaminación y prevención</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Control microbiológico de materias primas</b>	<b>6</b>
<b>2.3.1. Muestreo aséptico</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2. Aptitud de los métodos de recuento</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Métodos de recuento</b>	<b>8</b>
<b>2.4.1. Métodos de Cuenta en Placa</b>	<b>10</b>
<b>2.4.2. Método de Filtración en Membrana</b>	<b>11</b>
<b>2.4.3. Método del Número Más Probable</b>	<b>11</b>
<b>2.4.3.1 Fundamento del método</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Otros modelos del Número Más Probable</b>	<b>14</b>
<b>2.6. Implementación de la microescala en el método del Número Más Probable</b>	<b>16</b>
<b>2.6.1. Uso de sales de tetrazolio como indicadores de crecimiento</b>	<b>17</b>
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>19</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Objetivo general</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Objetivos particulares</b>	<b>20</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>21</b>

<b>6. Material y métodos</b>	<b>21</b>
<b>6.1. Tipo de estudio</b>	<b>21</b>
<b>6.2. Población de estudio</b>	<b>21</b>
<b>6.3. Variables</b>	<b>22</b>
<b>6.4. Materiales</b>	<b>22</b>
<b>6.5. Metodología</b>	<b>24</b>
<b>6.6. Análisis estadístico</b>	<b>27</b>
<b>6.7. Diagrama de flujo</b>	<b>28</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>29</b>
<b>8. Análisis de resultados</b>	<b>35</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>10. Perspectivas a futuro</b>	<b>43</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>44</b>
<b>Anexos</b>	<b>50</b>
<b>Anexo 1. Método del número más probable</b>	<b>50</b>
<b>Anexo 2. Tabla 0571.3. Número más probable de microorganismos</b>	<b>51</b>

## **1. Introducción**

En la industria farmacéutica una de las partes fundamentales dentro de la fabricación de medicamentos es el control de calidad de los mismos así como de las materias primas utilizadas en el proceso, la finalidad de este control es determinar si los productos cumplen con las características que los hacen propicios para su uso, éstas se denominan especificaciones y se determinan por la regulación sanitaria vigente en el lugar de fabricación. Dentro de estas características se encuentra la calidad microbiológica de los productos en la que se establece el límite de microorganismos encontrados en el producto así como la presencia de patógenos que pueden poner en riesgo la salud de los consumidores.

En México, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en su edición vigente es el documento encargado de establecer las especificaciones que deben cumplir las materias primas y los medicamentos fabricados y/o comercializados en el país; para realizar el control de calidad microbiológico de éstos productos cuenta con un método general de análisis, denominado límites microbianos (MGA 0571 Límites microbianos), en el que describe los procedimientos aplicables para el recuento de microorganismos dependiendo de la naturaleza del producto. Dentro de los métodos para el recuento de microorganismos la Farmacopea considera los métodos de conteo en placa, filtración por membrana y el número más probable, siendo éste último un método poco fiable al ser una estimación estadística del número de organismos viables presentes en la muestra.

Recientemente se ha buscado desarrollar métodos para el control de calidad microbiológico que permitan el ahorro de materiales y tiempo y además que

reduzcan los residuos provenientes de esta actividad, en pro del ambiente y la economía, estos métodos se denominan métodos microbiológicos alternativos y hasta ahora han visto su aplicación en la industria alimenticia; algunos de ellos involucran inmunoensayos y técnicas genéticas como la reacción en cadena de la polimerasa, sin embargo los reactivos y aparatos requeridos suelen ser costosos para ser aplicados en un análisis rutinario.

El método del número más probable es un método que se ha modificado para reducir el uso de materiales y aumentar su sensibilidad respecto al método estándar, incrementando también su confiabilidad y comparándose con métodos de recuento preferibles como el vaciado en placa y la filtración en membrana, sin embargo los trabajos para modificar y mejorar este método se han desarrollado en el control microbiológico de alimentos y hasta ahora no se ha probado su aplicación al análisis de materias primas y productos farmacéuticos que también son susceptibles de contaminarse con microorganismos que alteran la calidad del producto y pueden ser riesgosos para los consumidores. El presente proyecto busca implementar la microescala y las sales de tetrazolio como indicadores de crecimiento en la técnica del número más probable con el fin de reducir el uso de materiales y el tiempo requerido para obtener resultados permitiendo el ahorro de recursos dentro del control de calidad microbiológico en la industria farmacéutica.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Contaminación microbiológica en la industria farmacéutica**

Un medicamento es una sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga un efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, mientras que una materia prima es una sustancia de cualquier origen que se use para la elaboración de medicamentos o fármacos<sup>1</sup>. Debido a este origen tanto materias primas como medicamentos son susceptibles de la contaminación microbiana, esto puede incluir bacterias, hongos y levaduras; esta contaminación puede provenir de los insumos utilizados o introducirse durante el proceso de manufactura e incluso darse durante el almacenamiento y el uso del producto final. La contaminación de estos productos representa un riesgo potencial por dos razones, la primera es la degradación o descomposición del producto dada la versatilidad metabólica de los microorganismos, que puede modificar la estructura química de las sustancias produciendo la pérdida de la actividad terapéutica y también la alteración de las propiedades organolépticas del producto; la segunda razón es el potencial tóxico que representan algunos microorganismos para el ser humano debido a su patogenicidad, aunque este riesgo depende en gran medida del microorganismo presente, la vía de entrada y la respuesta inmunológica del sujeto.<sup>2</sup>

## 2.2. Fuentes de contaminación y prevención

La presencia de microorganismos en materias primas y medicamentos no puede evitarse totalmente debido al origen natural de la mayoría de los excipientes y a las condiciones ambientales en que se realiza la producción, es por ello que se establece un límite para la contaminación por microorganismos en los productos y en el caso de organismos patógenos se requiere asegurar su ausencia. Para lograr reducir la contaminación microbiana se deben identificar las fuentes potenciales de microorganismos en el proceso de manufactura, por lo general los excipientes de fuentes naturales como vegetales o derivados de animales contienen cargas altas de microorganismos; el agua es un insumo en el que microorganismos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.* o *Escherichia coli* pueden permanecer viables y trasladarse a procesos en los que es utilizada sobre todo cuando permanece estancada, las áreas de proceso y los equipos pueden contener en su superficie formas esporuladas de bacterias y esporas de hongos, sobre todo en zonas de difícil acceso como esquinas<sup>2</sup>. El aire utilizado en los sistemas de ventilación es también una fuente importante de microorganismos que pueden llegar al producto, en él pueden encontrarse más bacterias que hongos y algunos de los géneros que se encuentran comúnmente incluyen *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.* y *Arthrobacter sp.*, resaltando la presencia de patógenos como *S. aureus*, *S. epidermidis* y *M. luteus*; entre los hongos y levaduras comunes encontramos a *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* y *Curvularia sp.*, patógenos como *Candida albicans* y *Criptococcus sp.* también pueden trasladarse en el aire.<sup>3</sup>

Sin embargo la fuente más común de contaminación es el personal involucrado en el proceso sobre todo cuando se carece de prácticas de higiene adecuadas; se calcula que durante la actividad diaria se pierden unas  $10^4$  células epiteliales por minuto, producto de la descamación en las que se encuentran bacterias de la biota natural como *Staphylococcus aureus* y se pueden acarrear otras como *E. coli*.<sup>2</sup> Para eliminar estos riesgos se deben implementar procedimientos de limpieza y sanitización en las áreas de proceso y en los equipos que entran en contacto con el producto, así como procedimientos para la adecuada higiene y vestimenta del personal, también se debe contar con sistemas que permitan la disminución o eliminación de la carga microbiana en el agua y el aire utilizado en la ventilación. La NOM-059-SSA1-2013 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos y la NOM-164-SSA1-2013 Buenas prácticas de fabricación de fármacos, establecen en su numeral 8. Instalaciones y equipos, los requisitos mínimos que las áreas de proceso y los equipos utilizados deben cumplir para asegurar la calidad del producto, y en el caso del control microbiológico en el apéndice normativo A establece los límites de partículas viables para las áreas de producción de acuerdo al proceso que se realiza, la NOM-164-SSA1-2013 Buenas prácticas de fabricación de fármacos en su caso también señala los requerimientos físicos, químicos y microbiológicos que el agua utilizada en los procesos de fabricación de fármacos debe cumplir. Ambas normas establecen como requisito que existan procedimientos para la limpieza y sanitización de equipos, áreas y sistemas críticos.<sup>4,5</sup>

### **2.3. Control microbiológico de materias primas**

Las materias primas son las sustancias utilizadas en la fabricación de medicamentos e incluyen a los principios activos y los excipientes. El uso de materias primas con buena calidad es indispensable ya que de ellas puede derivar la contaminación de los medicamentos y de las áreas de producción causando la contaminación intermitente de otros productos. Las materias primas sintéticas son menos propensas a la contaminación ya que las condiciones en que se fabrican no suelen permitir el desarrollo de microorganismos, por otro lado materiales de origen natural como los excipientes que componen la mayor parte de los medicamentos son la fuente más importante de contaminación microbiológica, en ellos se encuentran comúnmente microorganismos no exigentes capaces de tolerar la baja humedad como *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp* y algunas bacterias Gram negativas.<sup>6</sup>

El control microbiológico de estos excipientes debe realizarse de acuerdo a lo establecido en las monografías individuales del producto en cuestión y los métodos de análisis adecuados de acuerdo a las leyes vigentes. En México el documento normativo que regula las especificaciones para excipientes es la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en su edición vigente; las especificaciones para cada uno se enlistan en forma de una monografía en la que se incluye el límite de microorganismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras que el producto puede contener por gramo o mililitro de muestra así como los microorganismos patógenos para los que se debe demostrar ausencia. Este control es realizado con base en el Método General de Análisis 0571 Límites microbianos, en el que se detallan los

medios de cultivo, las técnicas de preparación de la muestra y los métodos por los que se puede realizar el recuento de los diferentes tipos de microorganismos (mesófilos aerobios, hongos y levaduras) así como los medios de detección para organismos patógenos.<sup>7</sup>

### **2.3.1. Muestreo aséptico**

Para realizar el análisis microbiológico de materias primas es necesario asegurar que la contaminación microbiana proviene solamente del producto en cuestión, por lo que es necesario el muestreo del producto en condiciones asépticas.<sup>2</sup>

La FDA en su manual de microbiología farmacéutica considera los siguientes puntos para asegurar el muestreo aséptico del producto:<sup>8</sup>

- Las muestras deben almacenarse bajo las mismas condiciones establecidas en la etiqueta del empaque.
- Previo al análisis el exterior del contenedor debe ser desinfectado antes de llevarlo a la zona de trabajo o campana de flujo laminar.
- El área de trabajo en que se abra el contenedor debe ser una campana de flujo laminar u otro ambiente controlado para evitar la contaminación ambiental o por parte del personal.

Adicionalmente es necesario el uso de bata limpia, guantes estériles, cofia y cubre bocas por parte del personal durante el muestreo y la preparación de la muestra para el análisis; es indispensable el uso de envases estériles para almacenar la muestra.

### **2.3.2. Aptitud de los métodos de recuento**

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos establece como requisito que los métodos de recuento utilizados demuestren su aptitud para recuperar y cuantificar microorganismos en presencia del producto de prueba cada vez que se introduzca un cambio en el método o en el producto (cuando se trate de medicamentos).

La aptitud del método seleccionado para el análisis se prueba inoculando la muestra inicial del producto con una suspensión de alguno de los microorganismos de prueba (ver cuadro 1) que no exceda de 100 unidades formadoras de colonia, posteriormente esta muestra inoculada se procesa de acuerdo al método elegido y luego de la incubación (durante el menor periodo de tiempo especificado) se realiza el conteo de microorganismos; para los métodos de filtración en membrana y conteo en placa dicho conteo no debe diferir en un factor de 2 respecto del control (diluyente inoculado en ausencia del producto), es decir para 100 UFC el conteo debe encontrarse entre 50 y 200; para el número más probable el conteo debe encontrarse dentro de los límites al 95% de confianza de los resultados obtenidos con el control.

## 2.4. Métodos de recuento

Los métodos que la Farmacopea señala como adecuados para el recuento de microorganismos en un determinado producto incluyen el método de filtración por membrana, cuenta en placa por vaciado y por extensión y el método del número más probable (NMP), y se describen más adelante.

Cuadro 1. Microorganismos de prueba recomendados para la prueba de aptitud del método.

Microorganismo de prueba	Cepa	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIB 8054	FEUM 11, Farmacopea Europea.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCIMB 9518	FEUM 11, USP, Farmacopea Europea.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126	Farmacopea Europea, USP.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118	FEUM 11, USP, Farmacopea europea.

ATCC: American Type Culture Collection; CIP: Collection de l'Institut Pasteur; NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria. Se enlistan algunos de los microorganismos recomendados para la cuenta de organismos mesófilos aerobios.

La aplicación de estos métodos se encuentra en función de la naturaleza del producto y las especificaciones establecidas para el mismo. Hasta la novena edición de la farmacopea el método de límites microbianos sólo contemplaba las técnicas de cuenta en placa y el número más probable, especificando que el conteo en placa quedaba limitado a aquellos productos solubles en agua, que es el solvente utilizado en la preparación de los medios de cultivo, mientras que productos insolubles tanto

grasos como no grasos debían analizarse por el método del número más probable;<sup>9</sup> el método de filtrado por membrana se introdujo por primera vez en la décima edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.<sup>10</sup>

#### **2.4.1. Métodos de Cuenta en Placa**

La cuenta en placa por vaciado y por extensión tienen el mismo fundamento que es el crecimiento de los microorganismos en un medio de cultivo sólido dispensado en placas de Petri, la única diferencia reside en la técnica ya que en el vaciado en placa se debe transferir 1 mL de cada dilución de la muestra preparada como se describe en el método y después mezclarse con 15 a 20 mL del agar derretido a no más de 45 °C. En el método por extensión se deben tomar 0.1 mL de cada dilución de la muestra preparada y extenderse sobre el agar ya solidificado dentro de la caja de Petri, en ambos casos incubando de 30 a 35 °C de 3 a 5 días para mesófilos aerobios y de 20 a 25 °C por 5 a 7 días para hongos y levaduras<sup>7</sup>. En éste método el conteo de colonias en cada placa debe encontrarse entre 25 y 250 ya que a menos de 25 colonias se corre el riesgo de subestimar el contenido por gramo o mililitro del producto y a más de 250 colonias es posible confundir aquellas que sean contiguas y omitir aquellos microorganismos de crecimiento lento.<sup>11</sup> Debido a que el análisis de productos insolubles grasos requiere la formación de una emulsión es posible que algunos microorganismos queden atrapados en los glóbulos y no exista la difusión adecuada de nutrientes retrasando o impidiendo su crecimiento y omitiéndolos en la cuenta; los productos insolubles no grasos requieren la formación

de una suspensión cuyas partículas pueden ser confundidas con colonias, por ello en ambos casos el conteo en placa no es adecuado para estos productos.<sup>12</sup>

#### **2.4.2. Método de Filtración en Membrana**

En éste método la muestra del producto se filtra a través de una membrana, compuesta normalmente de acetatos o nitratos de celulosa, con un tamaño de poro nominal de no más de 45 micras;<sup>13</sup> la membrana se enjuaga con solución amortiguadora y luego se transfiere a una placa Petri que se incuba al igual que en el método de cuenta en placa, permitiendo la difusión de nutrientes desde el agar y a través de la membrana, sobre la que se multiplican los microorganismos viables formando colonias visibles y que son contadas.<sup>11</sup> Este método es particularmente útil cuando la contaminación por gramo o mililitro de muestra es muy baja, permitiendo filtrar volúmenes mayores a 10 mL además de facilitar el análisis de productos grasos de forma directa, sin embargo las partículas de productos insolubles en suspensión aún se transfieren a la placa y pueden provocar confusiones en el conteo de colonias.

#### **2.4.3. Método del Número Más Probable**

El método del número más probable es un método de recuento de microorganismos que se fundamenta en la probabilidad de encontrar microorganismos viables en diluciones seriadas de la muestra del producto analizado. La dilución continua del producto conlleva a la disminución seriada de los microorganismos presentes por lo

que la probabilidad de que las diluciones más altas de la muestra presenten crecimiento al ser cultivadas se reduce hasta que no se presenta dicho crecimiento<sup>14,15</sup> y tiene base en las siguientes suposiciones:

- La muestra se prepara de forma que las bacterias se encuentran distribuidas aleatoriamente en ella.
- Las bacterias no se encuentran en grupos ni se repelen entre ellas.
- El medio de cultivo y las condiciones se han elegido de forma que todo inóculo que contenga una sola célula viable producirá crecimiento visible.

En la Farmacopea el método descrito (anexo 1) requiere de la preparación de 3 diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  del producto y la inoculación de 1 mL de cada dilución en 3 tubos conteniendo 9 mL de caldo soya tripticaseína o dextrosa Sabouraud, obteniendo una batería de 9 tubos que, tras incubación entre 30 y 35 °C por no más de 5 días, son observados en busca de turbidez. Cada tubo positivo es contado en cada serie de dilución, los resultados se denotan como el número de tubos positivos (1, 2 o 3) por dilución iniciando con la dilución más baja, por ejemplo un resultado de un tubo positivo por dilución se denota como 1,1,1 mientras un resultado de 1 tubo positivo en la dilución  $10^{-1}$ , dos tubos positivos en la dilución  $10^{-2}$  y ninguno en la dilución  $10^{-3}$  se denota como 1,2,0. Estos resultados se comparan con la tabla 0571.3. Número más probable de microorganismos, incluida en el método (ver anexo 2); para cada combinación se estima el número más probable de microorganismos presentes por gramo o mililitro del producto y los límites superior e inferior de la estimación a un 95% de confianza.<sup>7</sup>

### 2.4.3.1. Fundamento del método

El número de microorganismos estimado resultante tras el análisis por el método de NMP es en realidad el número de organismos cuya probabilidad de ser verdadera es la más alta para obtener la combinación de tubos positivos que se observa tras la incubación. Debido a que el número de microorganismos presente en una cantidad determinada del producto es una variable cuantitativa discreta (es decir que sólo acepta valores enteros de 0 a infinito) ésta sigue una distribución de Poisson, que es la base estadística con que se calcula el número más probable de microorganismos una vez fijadas las siguientes variables:

- El número de diluciones utilizadas
- El número de repeticiones por dilución
- La cantidad de producto que está presente en cada repetición una vez inoculadas las diluciones.

El número más probable de microorganismos presentes está dado entonces por la siguiente fórmula:

$$\sum_{j=1}^k \frac{g_j^{m_j}}{1 - \exp(-\lambda m_j)} = \sum_{j=1}^k t_j^{m_j}$$

Donde:

- $K$  representa el número de diluciones

- $g_j$  denota el número de tubos positivos (con crecimiento) en la  $j$ -ésima dilución.
- $m_j$  denota la cantidad de producto presente en cada tubo de la  $j$ -ésima dilución.
- $t_j$  denota el número de tubos para cada dilución.
- $\lambda$  es la concentración de microorganismos presentes en la muestra sin diluir.

Esta sumatoria es resuelta para  $\lambda$  de forma iterativa de modo que todas las diluciones y repeticiones se toman en cuenta para el cálculo del NMP.<sup>16</sup>

Los intervalos de confianza al 95% son interpretados como el conjunto de valores que tienen una probabilidad de 0.95 de ser los verdaderos para un resultado del análisis del producto. Estos intervalos han sido calculados de diferente forma por estadistas, resolviendo iterativamente la fórmula de la menor concentración hacia arriba o bien utilizando una distribución logaritmo-normal del resultado obtenido para estimar dicho intervalo. Las tablas del NMP que se presentan en los documentos normativos presentan intervalos calculados de forma iterativa, sin embargo para otros modelos (vistos más adelante) algunos autores han demostrado que los intervalos obtenidos por cálculo utilizando una distribución logaritmo-normal no difieren significativamente de aquellos obtenidos por iteración.<sup>17, 18</sup>

## 2.5. Otros modelos del Número Más Probable

Si bien el método ya descrito del número más probable es poco exacto se ha encontrado que el uso de otros modelos con diluciones más cercanas y más repeticiones puede incrementar su sensibilidad reduciendo los extremos dentro del intervalo de confianza al 95%. De hecho, no existe fundamento teórico para que el modelo de 3 diluciones a 3 tubos por dilución sea empleado rutinariamente, simplemente es el modelo que permite calcular con mayor facilidad el factor de dilución de la muestra y contiene 3 repeticiones para que el resultado sea estadísticamente significativo, además de que permite el uso de tablas de un tamaño adecuado.<sup>14, 17</sup>

El Manual de análisis bacteriológico de la FDA contiene en su apéndice 2 tablas en las que se computan los NMP de microorganismos para modelos de 3, 5 y 10 tubos para cada dilución utilizando las mismas tres diluciones decimales, de ellas es posible observar que el incremento en repeticiones por dilución reduce el intervalo de confianza al 95%, aumentando la exactitud del método para estimar la carga microbiana del producto; como ejemplo se analiza un resultado en que sólo un tubo de la dilución más alta es negativo (denotado como 3,3,2), el NMP de organismos por gramo o mililitro al 95% de confianza para el modelo de 3 tubos es de 1100 con límites entre 180 y 4100, suponiendo que la cuenta real sea cercana a 1100 organismos por gramo o mililitro al utilizar el modelo de 5 tubos un resultado similar (920 organismos) tiene límites entre 220 y 2600 mientras el modelo con 10 tubos (1200 microorganismos) tiene límites de 480 a 2400.<sup>16</sup>

Russek y Coldwell, mediante la simulación de varios experimentos del NMP, demostraron que para este método el número mínimo de repeticiones por dilución del producto debe ser de 5, esto reduce el error asociado a la estimación. También sugieren el uso de modelos desbalanceados utilizando un mayor número de repeticiones en las diluciones intermedias, ya que en la dilución más baja se pretende encontrar crecimiento y en la más alta su ausencia las diluciones intermedias aportan al cálculo una mejor estimación del número de microorganismos y reducen el error.<sup>19</sup>

Si bien este tipo de modelos sugeridos da lugar a cálculos tediosos y una mayor probabilidad de combinaciones en los resultados, que resultan en tablas poco prácticas, el uso de hojas de cálculo o programas específicos puede permitir el uso de modelos con diluciones no seriadas y con un número diferente de repeticiones.<sup>17,20,21</sup> La FDA ha puesto a disposición una hoja de cálculo desarrollada por Garthright y Blodgett que permite el cálculo del número más probable utilizando modelos de hasta 18 diluciones y 1020 repeticiones por dilución, este instrumento es gratuito y se puede descargar de la página de internet de la dependencia.<sup>22</sup>

## 2.6. Implementación de la microescala en el método del Número Más Probable

El método de conteo por NMP de organismos puede ser más exacto, sin embargo el aumento en repeticiones y, en dado caso el cambio de diluciones, suponen un gasto de dos o tres veces más material y también de tiempo en su ejecución; para solucionar estos problemas el uso de técnicas a microescala supone una alternativa útil que permite diseñar modelos para NMP con múltiples repeticiones y más de tres diluciones, e incluso utilizar diluciones 1:2 o 1:5 y no en series de 10 como se realiza comúnmente. Los avances al respecto se han realizado para métodos de conteo en microbiología ambiental y de alimentos, la mayoría utilizando modelos muy variados de repeticiones y diluciones pero coincidiendo en el uso de las placas de micro titulación como base para simular los tubos en que se inocula la muestra, reduciendo drásticamente la cantidad de material necesario para desarrollar el método. En modelos como el descrito por Rowe y colaboradores<sup>23</sup> o Hernández y cols.<sup>24</sup> desarrollados en placas de 96 pozos y comparados con el método estándar para NMP se observan resultados muy diferentes, sin embargo las estimaciones por estos métodos tienen estadísticamente menos error debido al número de repeticiones; dado que la lectura del crecimiento se realiza con base en la turbidez del medio, el tamaño de los pozos y el volumen que contienen dificultan y a menudo imposibilitan la observación directa, por lo que estos métodos se valen de sustratos cromogénicos o fluorogénicos que presentan color por la actividad de microorganismos específicos, como ejemplo el método desarrollado para enumerar *Enterobacter sakazakii* en leche reconstituida utiliza un sustrato que al ser degradado por la  $\alpha$ -glucosidasa produce fluorescencia y sirve como indicador de la

presencia de la bacteria objetivo.<sup>25</sup> Este enfoque resulta particularmente útil cuando la sustancia analizada interfiere con la turbidez del medio, sin embargo los sustratos cromogénicos son específicos para organismos que producen enzimas capaces de transformar estas sustancias por lo que se requiere una aproximación en que el desarrollo de color o fluorescencia se deba al crecimiento general de diferentes microorganismos.

### **2.6.1. Uso de sales de tetrazolio como indicadores de crecimiento**

Las sales de tetrazolio son un grupo de sustancias cuyo esqueleto central es un anillo de 2H-tetrazol, sustituido en las posiciones 2, 3 y 5 generalmente por grupos fenilo que a su vez también están sustituidos y funcionan como cromóforos.<sup>26</sup> Estas sales, como el cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio (también conocido como p-iodonitrofenil tetrazolio o INT), reaccionan dentro de la célula con compuestos del sistema transportador de electrones, como el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido y algunas deshidrogenasas,<sup>27,28</sup> reduciéndose y produciendo la apertura del anillo de tetrazol y un compuesto colorido denominado formazán que en algunos casos (por ejemplo el cloruro de ciano-ditiolil tetrazolio) es fluorescente. Ya que el sistema transportador de electrones está presente en todos los sistemas vivos es posible asociar la producción de formazanes coloridos con la actividad metabólica de las células, por ello estas sales se han empleado para determinar la viabilidad de células eucariotas y procariotas en diferentes modelos.<sup>29, 30, 31</sup>

Debido a que la reducción de estos compuestos por la actividad celular es rápida, no depende de un aumento en la biomasa, sólo en la presencia de células

metabólicamente activas por lo que algunos ensayos a micro escala en placas de micro-titulación para diversas aplicaciones son posibles, estos incluyen la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias para diversas sustancias,<sup>32</sup> presencia de biofilms<sup>33</sup> y la presencia de microorganismos de interés en diversos ambientes y comunidades microbianas mediante la técnica del número más probable.<sup>34,35,36,37</sup> El uso de estas sales sin embargo no se ha encontrado reportado en el análisis microbiológico de alimentos ni de excipientes, fármacos y productos farmacéuticos.

### **3. Planteamiento del problema**

El análisis microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos es una parte fundamental del control de calidad que permite asegurar que el producto no perderá sus características físicas y químicas y que no provocará daño a los pacientes debido a la contaminación microbiana.

Los métodos microbiológicos utilizados de manera rutinaria en la industria farmacéutica han cambiado poco desde sus orígenes en el siglo XIX y tienen como principal desventaja el tiempo requerido para la obtención de resultados, variando de los 3 días (límites microbianos) a los 14 días (esterilidad) dependiendo del método, ya que se basan en el crecimiento visible de los microorganismos. En tiempos modernos la apertura del mercado a los medicamentos genéricos y la alta demanda obligan a la industria farmacéutica a reducir costos y tiempos de entrega, por lo que se requiere de nuevos métodos que permitan garantizar la calidad de un producto en tiempos más cortos, sin embargo la implementación de métodos más rápidos y sensibles se ha visto retrasada por los requerimientos de las autoridades sanitarias respecto a la validez y confiabilidad de los mismos cuando se aplican al análisis microbiológico rutinario.<sup>38,39</sup>

El método del número más probable es un método de conteo de microorganismos cuya exactitud puede incrementarse si se aumenta el número de repeticiones y de diluciones utilizadas del producto y volverse menos costoso al implementar el uso de materiales desechables y reutilizables de bajo volumen como las placas de micro titulación, adicionalmente se puede facilitar su interpretación y reducir el tiempo de incubación requerido al añadir un indicador de crecimiento al medio de cultivo, como

las sales de tetrazolio, que reaccionan con las sustancias reductoras en el sistema de transporte de electrones produciendo formazanes insolubles y coloridos que hacen evidente la presencia de microorganismos viables en la muestra.

En el presente proyecto se modificará e implementará la técnica del número más probable para determinar la calidad microbiológica de dos excipientes farmacéuticos de origen natural utilizados en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, utilizando un modelo a microescala que permita reducir la cantidad de materiales requeridos y aumentando la precisión respecto al método reportado en la undécima edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, que permite la implementación de métodos de análisis alternos si los resultados obtenidos son comparables a los del método descrito.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

- Modificar la técnica del número más probable, reportado en el MGA 0571 Límites Microbianos, a microescala en el análisis microbiológico de excipientes farmacéuticos.

### **4.2. Objetivos particulares**

- Demostrar la aptitud del método para el recuento de microorganismos mesófilos aerobios en los excipientes elegidos de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, undécima edición.
- Implementar la técnica a microescala y el uso de p-iodonitrofenil tetrazolio en el método del número más probable para el análisis microbiológico de los excipientes elegidos.

## **5. Hipótesis**

El método propuesto para la determinación del número más probable a microescala será apto para la cuantificación de organismos mesófilos aerobios en los excipientes farmacéuticos elegidos y arrojará resultados comparables al método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos undécima edición.

## **6. Material y métodos**

### **6.1. Tipo de estudio**

Se realizará un estudio experimental, prolectivo, longitudinal y comparativo.

### **6.2. Población de estudio**

La población de estudio serán lactosa anhidra y almidón de maíz, dos excipientes farmacéuticos, uno soluble en agua y otro insoluble de naturaleza no grasa.

- Criterios de inclusión: Excipientes farmacéuticos solubles en agua e insolubles de naturaleza no grasa utilizados en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza.
- Criterios de exclusión: Excipientes farmacéuticos insolubles de naturaleza grasa y excipientes líquidos.

### **6.3. Variables**

Independientes:

- Cepas de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Medio de cultivo.
- Control negativo (buffer de fosfatos pH 7.2).
- Concentración del indicador, cloruro de p-iodonitrofenil tetrazolio (INT).
- Excipientes seleccionados.

Dependientes:

- Número más probable de microorganismos por gramo de excipiente.

#### **6.4. Materiales**

- Placas de micro titulación de poliestireno Corning Costar de 96 pozos con fondo en V capacidad de 320  $\mu$ L.
- Tubos de ensayo con tapa de rosca de 16x150 mm.
- Matraz Erlen Meyer con tapa de rosca de 250 mL.
- Pipetas serológicas estériles de 1, 2 y 5 mL.
- Celdas para espectrofotómetro Thermo Scientific.
- Puntas Eppendorff de 200  $\mu$ L estériles.
- Micropipetas Transpette para 50, y 100  $\mu$ L.
- Multipipeta de 8 canales Biopette de 50-250  $\mu$ L.
- Asa bacteriológica calibrada de 0.01 mL.
- Filtro de membrana milipore de 0.2 micras.
- Jeringa estéril de 10 mL.
- Mechero Fisher.
- Espátula de acero inoxidable estéril.
- Espátula de plástico.
- Vial cónico de plástico estéril de 40 mL.
- Aspersores de plástico.

#### **Reactivos**

- Agar soya tripticaseína (AST), Bioxon Becton Dickinson.
- Caldo infusión de cerebro y corazón (BHI), Bioxon Becton Dickinson

- Caldo soya tripticaseína (CST), DIBICO.
- Caldo nutritivo (CN), DIBICO.
- Buffer de fosfatos pH 7.2.
- Cloruro de p-iodonitrofenil tetrazolio (INT), RA Sigma-Aldrich.
- Solución de Hipoclorito de sodio a 1000 ppm.
- Alcohol etílico al 70%
- Almidón de maíz grado farmacéutico.
- Lactosa anhidra grado farmacéutico.
- Agua destilada estéril.
- Extrán al 5%.

### **Microorganismos de referencia**

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

### **Equipo**

- Espectrofotómetro Spectronic 20+ Thermo Scientific.
- Incubadora Shel Lab.
- Balanza granataria Ohaus.
- Lámpara ultravioleta UVL-56 366 nm UVP Inc.
- Vortex Genie 2 Scientific Industries.

### **6.5. Metodología**

**Reactivación de los microorganismos de referencia:** Tomar un capilar de crioconservación y en condiciones asépticas transferir su contenido a un tubo conteniendo 10 mL de caldo BHI estéril; incubar a 37 °C por 24 horas. De este cultivo transferir en condiciones asépticas 100 µL a un tubo conteniendo AST inclinado y con ayuda del asa microbiológica extender el inóculo sobre toda la superficie; incubar a 37 °C por 24 horas, de este cultivo se prepara la suspensión de microorganismos.

**Preparación de la suspensión de microorganismos:** Preparar un inóculo estandarizado de los microorganismos de prueba en buffer de fosfatos pH 7.2 preparado según la FEUM undécima edición. De acuerdo al tubo 1 de la escala de McFarland, que equivale a  $3 \times 10^8$  UFC/mL, ajustar la suspensión midiendo transmitancia a 580 nm (el tubo de referencia da un %T aproximado de 65%). De esta suspensión realizar una dilución 1:100 con buffer de fosfatos pH 7.2 hasta obtener aproximadamente  $3 \times 10^6$  UFC/mL; tomar 100 µL de la última dilución y agregar 2.9 mL de buffer de fosfatos pH 7.2, cada mL de la suspensión resultante contiene aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

**Preparación del medio de cultivo para el método estándar:** De acuerdo al fabricante, pesar 2.7 g del medio deshidratado de CST y disolver en 90 mL de agua destilada. Dispensar 9 mL del caldo en 9 tubos de ensayo con tapa de rosca y esterilizar por calor húmedo a 121 °C y 15 psi por 15 minutos.

**Preparación del medio de cultivo para el método modificado:** Preparar 80 mL de caldo nutritivo (CN) triconcentrado con indicador de INT de la siguiente forma: Disolver 2.4 g del medio deshidratado de caldo nutritivo en 80 mL de agua dentro

de un matraz Erlen Meyer con tapa de rosca de 250 mL, esterilizar por calor húmedo a 121 °C y 15 psi por 15 minutos. Por otra parte pesar 20 mg de p-iodonitrofenil tetrazolio y disolver en 20 mL de agua con ayuda de un sonicador para obtener una solución a 1 mg/mL; tomar con una jeringa estéril de 20 mL y filtrar por membrana milipore de 0.2 micras recibiendo el líquido en el caldo nutritivo enfriado; el medio de cultivo resultante contiene 0.2 mg/mL del indicador INT.

**Prueba de aptitud del método:** Lavar con extrán la placa de microtitulación, enjuagar con agua desionizada y sanitizar con hipoclorito de sodio a 1000 ppm. Dejar reposar 15 minutos y sacudir el excedente del desinfectante, enjuagar con agua destilada estéril dos veces. En condiciones asépticas transferir 150 µL del medio de cultivo a cada pozo de la placa en 5 filas y 10 columnas, reservar las placas tapadas para evitar contaminación.

Preparar una suspensión 1:2 del producto de prueba en buffer de fosfatos pH 7.2 pesando en condiciones asépticas 5 g de almidón de maíz o lactosa anhidra, agregar 10 mL de buffer pH 7.2 y con ayuda de un vortex homogeneizar la suspensión. Inocular con 100 µL del inóculo estandarizado y homogeneizar. En condiciones asépticas realizar diluciones de las suspensiones inoculadas para obtener 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 mg/ mL de excipiente. Para el control (+) se inocula 10 mL de buffer pH 7.2 con 100 µL de cada suspensión de microorganismos y se realizan diluciones de la misma forma que los excipientes.

Transferir 100 µL de las diluciones del producto de prueba a cada pozo utilizando la primera columna para la dilución más concentrada y la novena columna para la más

diluida. La décima columna se utiliza como control negativo inoculando con buffer pH 7.2. Incubar las placas a 37 °C de 24 a 72 horas y observar el cambio de color cada 24 horas.

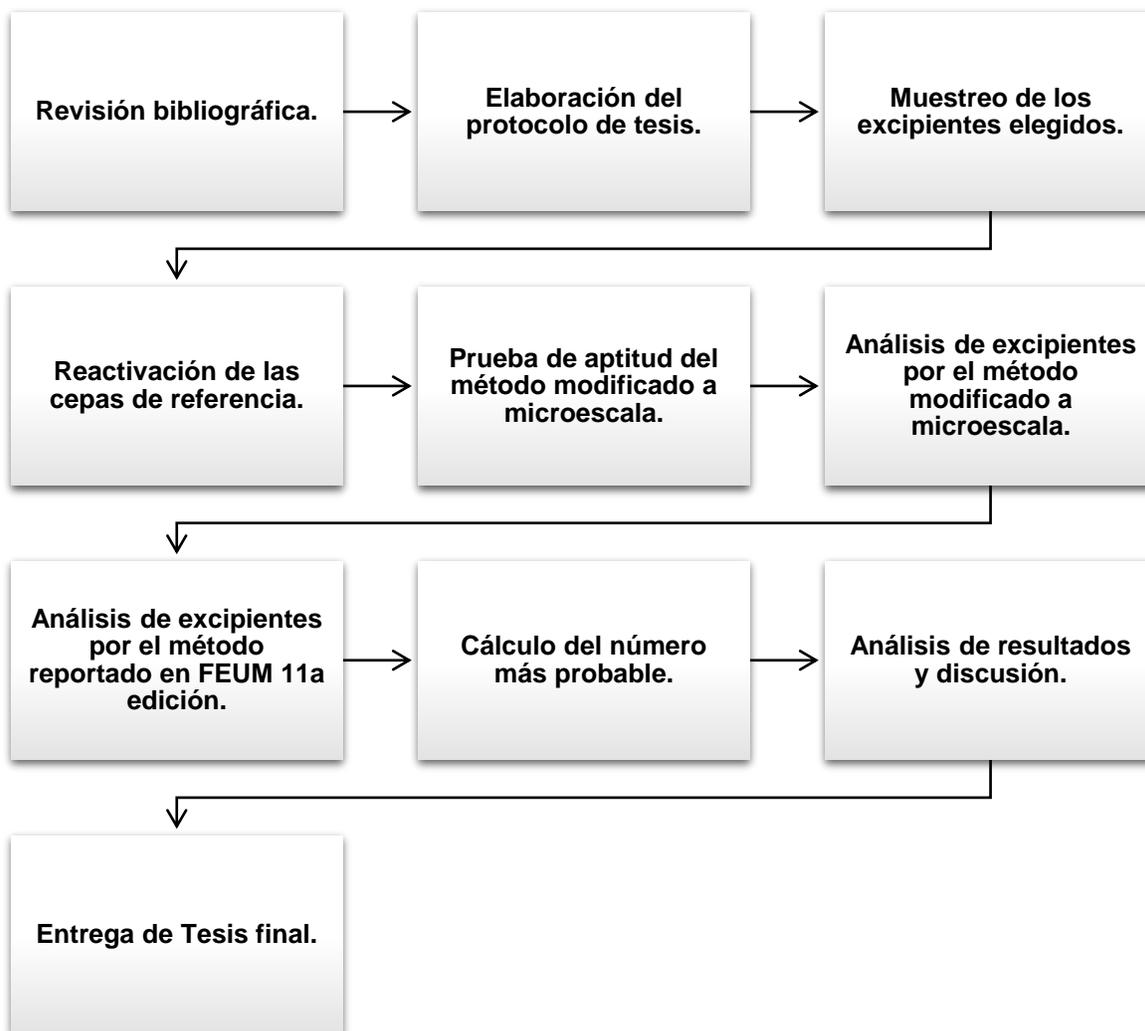
**Análisis del producto:** Preparar una suspensión 1:2 del producto de prueba en buffer de fosfatos pH 7.2 pesando en condiciones asépticas 5 g de almidón de maíz o lactosa anhidra, agregar 10 mL de buffer pH 7.2 y homogeneizar la suspensión con ayuda de un vortex; realizar diluciones seriadas para obtener concentraciones de 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 mg/mL. En condiciones asépticas y en una placa preparada como en la prueba de aptitud del método inocular con 100 µL de cada dilución del producto de prueba siguiendo el mismo esquema. Incubar las placas a 37 °C por 24 a 72 horas y observar el cambio de color cada 24 horas.

En paralelo inocular con 1 mL de las diluciones a 100, 10 y 1 mg/mL por triplicado los tubos con CST, incubar a 37 °C de 1 a 3 días observando cambio en la turbidez cada 24 horas.

## **6.6. Análisis estadístico**

Para realizar el cálculo del número de microorganismos por gramo del producto en el método modificado así como sus intervalos de confianza al 95% se utilizó la hoja de cálculo desarrollada por Garthright y Blodgett, puesta a disposición por la FDA en su página de internet. Para el cálculo del NMP y sus intervalos de confianza al 95% para el método estándar se utilizó la tabla proporcionada dentro del método de límites microbianos de la FEUM undécima edición.

## 6.7. Diagrama de flujo



## **7. Resultados**

Los resultados obtenidos se presentan por separado para la prueba de aptitud del método propuesto y para el análisis de los excipientes elegidos. Se describe lo observado en cada placa tras los diferentes tiempos de incubación y se presentan las imágenes tomadas de las mismas. Los estimados para la carga microbiana se presentan en tablas junto con los intervalos de confianza al 95% para cada método empleado.

### **Prueba de aptitud del método.**

Tras incubación a 37 °C por 72 horas se obtuvieron diferentes resultados en las placas que contenían los dos excipientes y el control inoculados con los organismos de prueba.

Las placas conteniendo excipientes inoculados con *Escherichia coli* mostraron un fuerte cambio de color desde las 24 horas de incubación y ya no se observaron cambios después de 48 horas, los controles negativos no mostraron turbidez ni cambio de color por lo que se descarta contaminación en la placa (figuras 1 a 3). Las placas con excipientes inoculados con *Staphylococcus aureus* no mostraron cambio de color tras las 72 horas de incubación por lo que se investigaron las posibles causas (figura 4).

Tras no observar crecimiento se probó que el diluyente o el medio de cultivo no fueran causantes de la inhibición inoculando 100 µl de las suspensiones del microorganismo en CN triconcentrado sin indicador INT. Tras incubar a 37 °C por

24 horas se observó crecimiento intenso por la turbidez del medio, por lo que se descartó que tanto el buffer como el medio causaran la inhibición (figura 5).



Figura 1. Placas inoculadas con *Escherichia coli* tras 24 horas de incubación. De izquierda a derecha: Control positivo (bacteria en buffer pH 7.2), lactosa y almidón. El control positivo fue inoculado por error de forma inversa (la dilución más baja en la columna 9), en la placa con almidón la columna 1 no contiene excipiente. El crecimiento se denota por un cambio intenso de color en los pozos, los controles negativos no muestran cambios por lo que se descarta contaminación en las placas.



Figura 2. Placas inoculadas con *Escherichia coli* tras 48 horas de incubación. De izquierda a derecha: Control positivo (bacteria en buffer pH 7.2), lactosa y almidón. Se puede apreciar el cambio de color en pozos que a las 24 horas no lo presentaban en las placas con Control positivo y lactosa. La placa con almidón permaneció sin cambios.

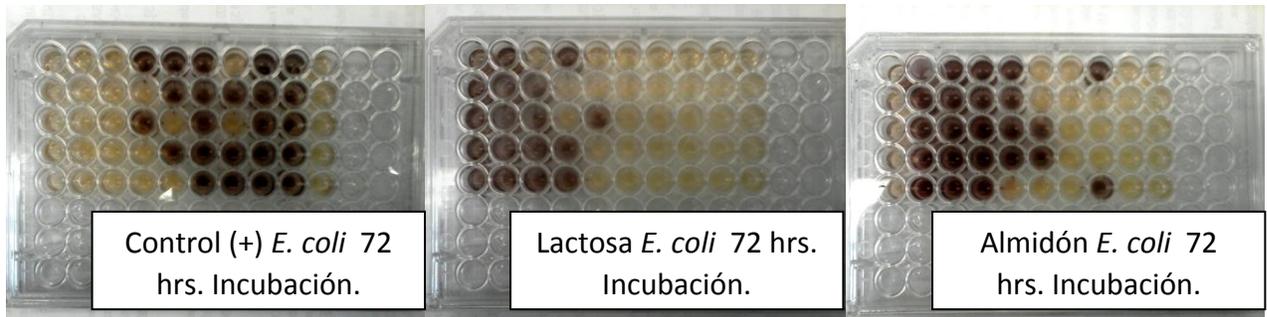


Figura 3. Placas inoculadas con *Escherichia coli* tras 72 horas de incubación. De izquierda a derecha: Control positivo (bacteria en buffer pH 7.2), lactosa y almidón. No existen más cambios de color en otros pozos; los controles negativos siguen sin cambio de color por lo que se descarta contaminación en las placas.



Figura 4. Placas inoculadas con *Staphylococcus aureus* tras 72 horas de incubación. De izquierda a derecha: Control positivo (bacteria en buffer pH 7.2), lactosa y almidón. No existe cambio de color en ninguna de las placas.

Debido a que las placas se sanitizaron con hipoclorito de sodio a 1000 ppm se sospechó que residuos del agente químico pudieran causar la inhibición por lo que se repitió el ensayo con placas irradiadas por 5 minutos con luz ultravioleta. Tras incubación por 72 horas no se observó cambio en los controles ni en los pozos inoculados, sólo se observó crecimiento en un pozo de las placas conteniendo lactosa que pudo deberse a contaminación durante el manejo más que por la ineficiencia del protocolo de sanitización. Esto puede deberse a una presuntiva inhibición del colorante INT sobre *Staphylococcus aureus* (figura 6).



Figura 5. Tubos con caldo nutritivo triconcentrado inoculados con 100  $\mu$ L de las suspensiones utilizadas e incubados por 24 horas. A) Control negativo, B) suspensión final a  $1 \times 10^5$  UFC/mL, C) suspensión a  $3 \times 10^6$  UFC/mL, D) suspensión ajustada a  $3 \times 10^8$  UFC/mL, E) líquido remanente tras re suspender el m.o. en agar ST. Todos los tubos muestran turbidez por crecimiento de la bacteria.

El cálculo del número más probable en la prueba con *E. coli* realizado con la hoja de cálculo proporcionada por la FDA arrojó resultados dentro del intervalo de confianza para lactosa y el control negativo; el cálculo para almidón quedó sobreestimado por un error de inoculación en que el volumen de inóculo fue el doble del propuesto para el ensayo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cálculo del número más probable de microorganismos para excipientes inoculados con *E. coli* ATCC 25922 (UFC/g)

Excipiente	NMP	Intervalo de confianza 95 %
Lactosa	137	73 - 259
Almidón	621	334 – 1157
Control*	232	131 - 410

Los números han sido redondeados al entero inmediato de los decimales que arroja el cálculo. \*Control = Buffer pH 7.2 simulando 5 mL de excipiente inoculado con  $10^4$  UFC y diluido 1:2.



Figura 6. Placas sanitizadas por radiación UV, inoculadas con *S. aureus* e incubadas por 72 horas. No se observa cambio de color en las placas; la placa con lactosa presenta cambio de color en el pozo E8 que indica crecimiento por contaminación.

### **Análisis del producto**

Tras 72 horas de incubación tanto las placas conteniendo almidón como lactosa no mostraron cambios visibles en la coloración del medio (figura 7) a excepción de un pozo en la columna 9 que indica contaminación. Los tubos con CST, utilizados en el método estándar, inoculado con las diluciones decimales de almidón y lactosa no mostraron cambio en la turbidez tras 72 horas de incubación, transcurrido este tiempo se inspeccionó el olor del medio como indicador de crecimiento, sin encontrar cambios (figura 8).

Finalmente el resultado del análisis de ambos excipientes por ambos métodos cumple con la especificación de las monografías individuales para límites microbianos, establecida como menos de 1000 UFC/g para el almidón de maíz y menos de 100 UFC/g para la lactosa anhidra (cuadro 3).

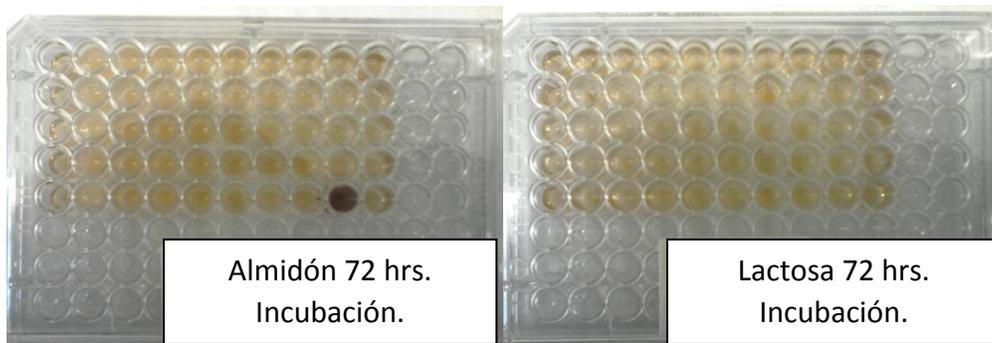


Figura 7. Excipientes analizados por el método modificado tras incubación por 72 horas, almidón (izquierda) y lactosa (derecha). Se observa el cambio de color en el pozo E9 de la placa de almidón por contaminación, no hay crecimiento en el resto de la placa.

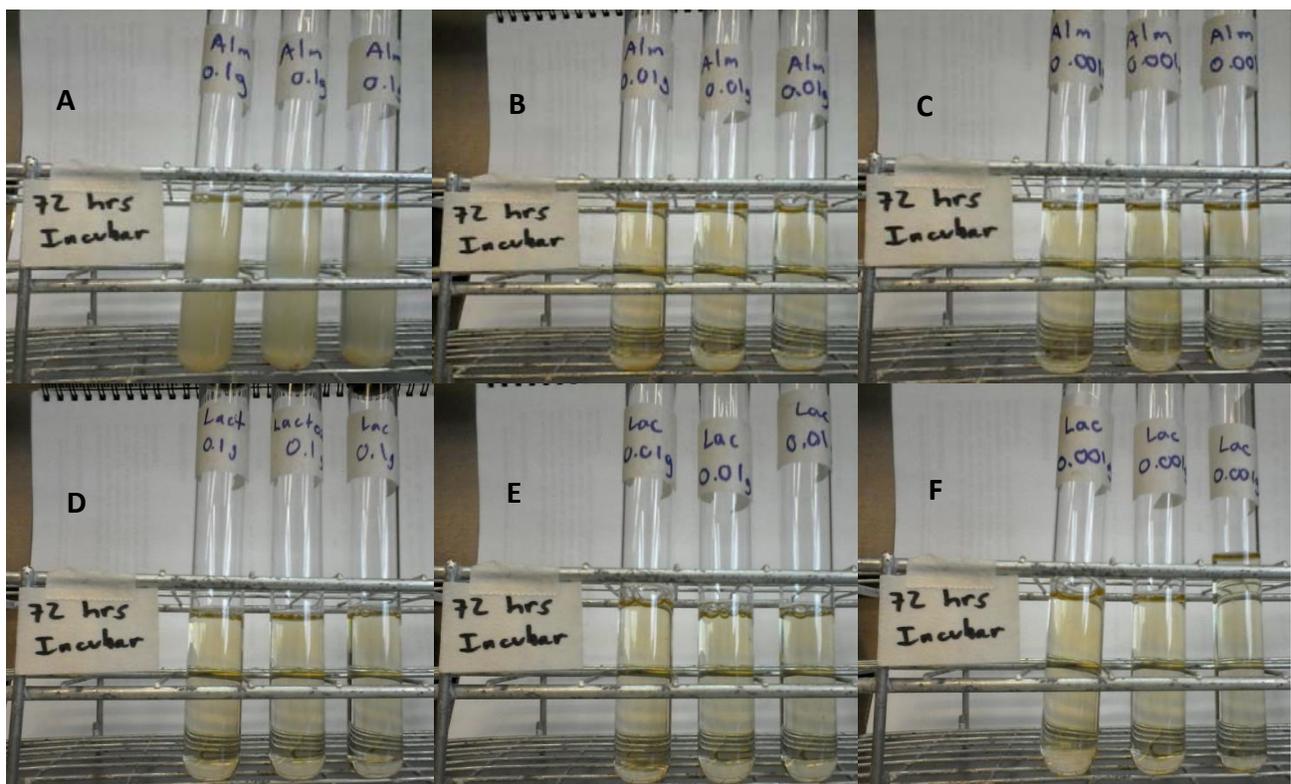


Figura 8. Excipientes analizados por el método estándar del número más probable tras incubación por 72 horas. Incisos A, B y C, diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  de almidón respectivamente; incisos D, E y F, diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  de lactosa. En la dilución  $10^{-1}$  (inciso A) se observa la turbidez por re-suspensión del almidón, el resto de las diluciones se muestran transparentes; ninguno de los 18 tubos empleados muestra turbidez por crecimiento microbiano.

Cuadro 3. Cálculo del número más probable (UFC/g) de microorganismos para excipientes por método estándar (FEUM) y método modificado (micro técnica)

Excipiente	NMP		Intervalo de confianza 95 %		Especificación
	FEUM	Micro técnica	FEUM	Micro técnica	
Lactosa	< 3	< 2	0 - 9.4	0 – 15	Menos de 100 UFC/g
Almidón	< 3	<2	0 – 9.4	0 - 24	Menos de 1000 UFC/g

Los números han sido redondeados al entero inmediato del decimal que arroja el cálculo para el método modificado, los valores tomados de la FEUM undécima edición no se redondearon.

## 8. Análisis de resultados

En un inicio el método modificado fue diseñado para trabajar con caldo soya tripticaseína, el mismo medio de cultivo que el método estándar, sin embargo durante la adición de la solución conteniendo INT se mostró un cambio inmediato de color a rojo intenso debido a la reducción del indicador en presencia de la glucosa contenida en el medio de cultivo, esto llevó a la modificación del medio a emplear (figura 9). El medio de crecimiento general disponible en el laboratorio en el momento fue caldo nutritivo, que se preparó al triple de la concentración sugerida por el fabricante para promover de forma similar el crecimiento a comparación del caldo soya tripticaseína; tras la adición del indicador a este medio no se observó la reducción inmediata e incluso permaneció estable tras refrigeración durante una semana, por lo que se empleó en los experimentos subsecuentes.

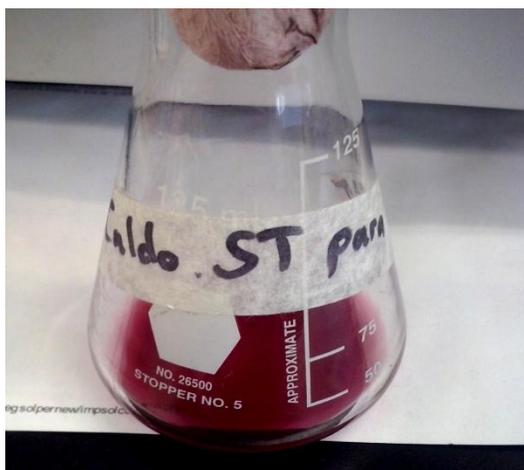


Figura 9. Coloración del medio de cultivo Caldo Soya Tripticaseína inmediatamente tras la adición de la solución filtrada de INT.

Otra modificación realizada para probar la aptitud del método de recuento fue la del inóculo inicial, que se elevó de 100 a  $10^4$  UFC; la razón es que a 100 UFC en

el método estándar las diluciones del producto y el volumen de las diluciones que se transfieren a los tubos (1 mL) permiten en teoría tener 10 UFC/tubo en la primer serie y 1 UFC/tubo en la segunda, en el método modificado las alícuotas son diez veces menores por lo que a un inóculo inicial de 100 UFC teóricamente se transfiere sólo 1 UFC/pozo en la primer serie y en el resto no existirían microorganismos; a un inóculo de  $10^4$  UFC en la primer dilución se obtienen en teoría  $10^3$  UFC/mL de dicha dilución, esto permite asegurar que al menos las primeras 4 columnas contendrán más de 10 UFC y se observará crecimiento en los pozos.

Los resultados obtenidos para la prueba de aptitud del método propuesto para *Escherichia coli* en presencia de los excipientes mostraron una variación considerable respecto al control utilizado. El método de límites microbianos establece que en esta prueba la estimación del número de microorganismos en los excipientes inoculados debe de encontrarse dentro del intervalo de confianza al 95% obtenido para la estimación del control, si bien el estimado para lactosa (137 UFC/g) se encuentra en el intervalo del control (131 a 410 UFC/g) el valor se aproxima al límite inferior.

El estimado para almidón no se encuentra dentro del intervalo de confianza del control debido a un error en el manejo del inóculo, debido a la dificultad para el manejo de este excipiente la primer dilución utilizada es 1:4 y no 1:2 como en la lactosa (es decir 250 mg/mL y no 500 mg/mL del excipiente) y sin embargo ambas se inocularon con  $10^4$  UFC/mL lo que produjo crecimiento en diluciones donde no se esperaba ( $2.5 \times 10^{-4}$  mg/mL con 2 tubos positivos); si se descarta el crecimiento

en esta dilución se obtiene un NMP de 230 UFC/g (con un IC de 121 a 436 UFC/g) que se ajusta de buena manera al intervalo de confianza del control. Debe notarse que para la prueba de aptitud en presencia de *E. coli* los resultados pueden considerarse como definitivos a las 48 horas de incubación, 24 horas menos que el tiempo sugerido por la FEUM, ya que no se observa cambio en el color de otros pozos después de este periodo de incubación.

Los estimados del NMP calculados difieren por un factor de 10 de la cantidad teórica de bacterias inoculadas en la muestra (el estimado ronda 200 UFC/g cuando el inóculo teórico es de 2000 UFC/g); debido a que el ajuste de la suspensión bacteriana se realiza por turbidez no se puede garantizar que el 100% de las células presentes se encuentren viables, además la dilución de la suspensión estandarizada puede tener error ya que tampoco se puede asegurar una distribución totalmente homogénea de bacterias en las alícuotas, sin embargo el factor que más error introduce es el ajuste realizado de manera visual en los experimentos definitivos debido a una falla en el espectrofotómetro cuyas lecturas de transmitancia oscilaban de manera aleatoria por lo que se desconoce la aproximación real de la suspensión utilizada respecto a la de referencia. Otro factor que puede estar involucrado es un efecto inhibitorio del indicador sobre las bacterias, como se discute más adelante, que si bien no se encontró reportado en la literatura para *E. coli* podría presentarse cuando la carga microbiana en el medio es muy baja (por ejemplo menos de 10 UFC) como en los pozos de la columna 5, 6 y 7 que teóricamente contienen 5, 2 y 1 ufc del microorganismo.

En el caso de la prueba realizada con *Staphylococcus aureus* no se observó crecimiento; como ya se mencionó en los resultados se realizaron varias pruebas para descartar los posibles factores que pudiesen inhibir a la bacteria. El primer factor analizado fue el buffer de fosfatos pH 7.2, de estar mal preparado podría provocar un desbalance osmótico y la disminución en la viabilidad del inóculo, sin embargo la inoculación de las suspensiones del microorganismo ( $3 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^6$ , y  $1 \times 10^5$  UFC/g) en caldo nutritivo triconcentrado y su posterior incubación mostraron un incremento considerable en la turbidez del medio lo que descartó de manera definitiva no sólo que el buffer estuviese mal preparado, también demuestra que el medio de cultivo propuesto para el método modificado es adecuado y suficiente para sostener el crecimiento de *S. aureus*.

El siguiente factor analizado fue el sanitizante utilizado, ya que las placas de poliestireno empleadas no pueden ser esterilizadas por calor húmedo se recurre a un protocolo de sanitización con hipoclorito de sodio ajustado a 1000 ppm que de acuerdo a Barrientos-Hernández<sup>40</sup> es la concentración mínima que funciona como bactericida en superficies eliminando el 99.99% de microorganismos viables; debido a esto y a pesar de que las placas se enjuagan dos veces con agua estéril se decidió eliminar la variable de los posibles residuos de hipoclorito al exponer las placas a radiación ultravioleta de onda larga por 5 minutos. Tras el desarrollo del método y la incubación por 72 horas no se observó crecimiento por lo cual se descartó la inhibición por cloro residual, si bien es cierto que se encontró crecimiento en un pozo de las placas conteniendo almidón y lactosa esto sólo se manifestó en 1 de los 50 pozos que se utilizan de cada placa y en 2 de las 5

placas irradiadas de esta manera, se sabe que estos pozos positivos indican contaminación pero es más probable que se haya dado por mal manejo del material utilizado para inocular los pozos, posiblemente el roce de la punta para micropipeta en una superficie no estéril.

Al realizar la búsqueda de referencias sobre algún efecto inhibitorio de las sales de tetrazolio se encontró que se ha probado la inhibición de crecimiento de estos compuestos en algunas especies bacterianas, específicamente el INT utilizado en nuestro trabajo presenta un efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* a concentraciones tan bajas como  $65 \mu\text{g/mL}$ <sup>41</sup> en el medio de cultivo, la concentración de dicho indicador en el medio utilizado para nuestro método modificado es de  $200 \mu\text{g/mL}$ , es por esta razón que la bacteria nunca mostró crecimiento durante el desarrollo experimental. Si bien la inhibición por parte del indicador no se encontró reportada para otras especies bacterianas es probable que se presente cuando la carga microbiana en el medio es mínima.<sup>42</sup>

Un resultado no concluyente y no considerado en el análisis de materias primas se obtuvo para una placa inoculada con almidón de maíz en un experimento previo con *S. aureus*. En la dilución más baja tres de los pozos mostraron precipitación de formazán en el fondo, aunque la materia prima se inoculó con el coco Gram positivo se sabe que el INT inhibe su crecimiento por lo que este precipitado debió resultar por presencia de contaminación en la materia prima (no existe crecimiento en otros pozos ni en los controles). El precipitado es pequeño lo que supone debió provenir de una cantidad muy baja de microorganismos, además al darse en el fondo de la placa, por debajo de la masa precipitada del excipiente, es posible que

la presencia de oxígeno se viera reducida permitiendo el desarrollo de un organismo facultativo, ya se ha reportado que en condiciones de baja o nula presencia de oxígeno también se da la reducción de ciertas sales de tetrazolio<sup>43</sup> por lo que el alcance de esta técnica puede extenderse a la cuantificación de microorganismos anaerobios de acuerdo a lo establecido en la FEUM undécima edición.

De los resultados obtenidos para el análisis de los excipientes se observa que tanto el método estándar como el método modificado arrojaron resultados similares. Tras 72 horas de incubación la placa con lactosa y almidón y las series de tubos conteniendo almidón y lactosa no mostraron cambio respecto a su apariencia inicial, esto indica una carga microbiana tan baja que ninguno de los dos métodos es capaz de detectar y por lo tanto está reportada como menos de 3 UFC/g y menos de 2 UFC/g para los métodos estándar y modificado respectivamente. Estos estimados corresponden a una cantidad de microorganismos menor a la que es más probable si se encontrara crecimiento en un tubo de la primer dilución, ya que la solución al cálculo con cero tubos positivos da una indeterminación el resultado debe expresarse en términos menores a la cantidad estimada para un tubo positivo.

En el caso del análisis por el método estándar se demostró la interferencia del producto con la lectura de turbidez, ya que las bacterias tienden a precipitarse resuspender el contenido de los tubos impide saber que parte de esa turbidez pueda deberse al crecimiento microbiano y en estos casos la FEUM recomienda el subcultivo en placa para verificar la presencia de microorganismos en el medio,

este problema se logra evitar en el método modificado ya que la aparición de color debida a la reducción del indicador contrasta lo suficiente para determinar la presencia de microorganismos sin necesidad de un subcultivo que requiere el uso de material y medio de cultivo incrementando el tiempo en que los resultados del análisis se obtienen.

El método modificado propuesto permite resolver el problema de la interferencia por turbidez en la técnica del número más probable aplicada a excipientes insolubles, evitando así el uso de material extra, además logra reducir el tiempo de obtención de resultados definitivos y la cantidad de material y medios de cultivo utilizados así como el espacio requerido para su incubación; a manera de comparación una placa empleada para el análisis de un solo producto consume 7.5 mL de medio de cultivo mientras un solo tubo (de los 9 requeridos) en el método estándar requiere 9 mL. Si bien es cierto que el método modificado utiliza tres veces más diluciones, éstas pueden realizarse a volúmenes finales de 4 ó 5 mL en lugar de los 10 mL normalmente utilizados.

El método propuesto aún no es aplicable pues no logró cuantificar a *S. aureus* en la prueba de aptitud realizada debido a la inhibición que el INT tiene sobre la bacteria. Es notable también que el protocolo de desinfección de la placa utilizando hipoclorito de sodio ajustado a 1000 ppm es efectivo pues no se observó interacción con el indicador, no deja residuos y se descartó la inhibición de los microorganismos por su presencia.

## 9. Conclusiones

Se logró modificar la técnica del número más probable, llevándola a microescala, para el análisis microbiológico de dos excipientes farmacéuticos, lactosa anhidra y almidón de maíz.

No se logró demostrar la aptitud del método para el recuento de *Staphylococcus aureus* en los excipientes elegidos de acuerdo a lo establecido por la FEUM undécima edición.

Se logró implementar la técnica a microescala del número más probable para el análisis microbiológico de los excipientes elegidos, obteniendo resultados similares a los del método estándar. También se logró implementar el uso de p-iodonitrofenil tetrazolio en el método, eliminando la interferencia por turbidez del producto al observar el crecimiento por cambio en el color del medio.

## 10. Perspectivas a futuro

El método desarrollado en el presente trabajo aún debe mejorarse para poder ser implementado de manera rutinaria en el análisis microbiológico de excipientes. Se propone explorar los siguientes alcances en virtud de los resultados obtenidos:

- Utilizar una concentración menor a 65  $\mu\text{g/mL}$  del indicador cloruro de p-iodonitrofenil tetrazolio para evitar la inhibición del microorganismo de referencia *S. aureus*.
- No incorporar el indicador directamente al medio de cultivo, si no agregarlo a los pozos tras una incubación previa, similar a lo realizado por Bartlett y colaboradores.
- Implementar el uso de otras sales de tetrazolio que presenten un menor efecto inhibitorio o que éste sea nulo.
- Probar la aptitud del método en el análisis de otro tipo de excipientes así como de productos farmacéuticos intermedio, a granel y terminado.
- Utilizar la radiación UV como protocolo preferido de eliminación de la viabilidad microbiana para reducir el uso de agentes químicos.

## 11. Referencias

1. Ley General de Salud, Cap. IV, art. 221 fracc. I y III. DOF 24-04-2013, pp 72-73.
2. Denyer SP, Baird RM. Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices, 2ª ed. USA, 2007. CRC Press. pp. 24-29, 156-157.
3. De la Rosa MC, Ullán C, Prieto MP, Mosso MA. Calidad microbiológica del aire en una zona limpia en una industria farmacéutica. Anal Real Acad Farm. 2000;66(2);1-17.
4. NOM-059-SSA1-2013 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. DOF 22-06-2013.
5. NOM-164-SSA1-2013 Buenas prácticas de fabricación para fármacos. DOF 25-06-2013.
6. De la Rosa MC, Medina MR, Vivar C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. Pharmaceutica Acta Helvetiae. May 1995;70;227-232.
7. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ª edición. México, 2014. Secretaría de Salud. pp 433-444.
8. Food and Drug Administration. Pharmaceutical microbiology manual. USA, 2014. Food and Drug Administration. pp 5-6.
9. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 9ª edición. México, 2009. Secretaría de Salud. pp 415.

10. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 10ª edición. México, 2011. Secretaría de Salud. pp 416-427.
11. Mandigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock, biología de los microorganismos, 10ª ed. Madrid, 2007. Prentice Hall Educación. pp 145-147.
12. Aulton ME, Taylor KMG. Aulton's pharmaceuticals, the design and manufacture of medicines, 4ª edición. Reino Unido, 2013. Elsevier Churchill Livingstone. pp 239-241.
13. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiología. Madrid, 2004. McGraw-Hill Interamericana. pp 152-153.
14. Sutton S. The most probable number method and its uses in enumeration, qualification and validation. *Journal of Validation Technology*. 2010:35-38.
15. Beliaeff B, Mary JI. The most probable number estimate and its confidence limits. *Wat. Res.* 1993:27(5);799-805.
16. Garthright WE. Appendix 2 Most probable number from serial dilutions. En: *Bacteriological Analytical Manual*. USA, 2001. Food & Drug Administration. pp 575-580.
17. Garthright WE, Blodgett RJ. FDA's preferred methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. *Food Microbiology*. 2003:20;439-445.
18. Best DJ. Optimal determination of most probable numbers. *International Journal of Food Microbiology*. 1990:11;159-166.
19. Russek E, Coldwell RR. Computation of most probable numbers. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983:45(5);1646-1650.

20. Weisswange TG, Dott W. Application of microtitration technique for most probable number estimation of bacteria. *Wat. Sci. Tech.* 1988;20(12);417-420.
21. Briones AM, Reichardt W. Estimating microbial population counts by most probable number using Microsoft Excel. *Journal of Microbiological Methods.* 1999;35;157-161.
22. BAM Appendix 2: Most probable number from serial dilutions. [En línea]. Maryland: U.S. Food and Drug Administration; c2015 [Última actualización 15 Ene 2015; citada el 11 May 2015] Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>
23. Rowe R, Todd R y Waide J. Microtechnique for most probable number analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977;33(3);675-680.
24. Hernandez JF *et al.* MPN miniaturized procedure for the enumeration of faecal enterococci in fresh and marine waters: The must procedure. *Wat. Res.* 1993;27(4);597-606.
25. Oh SW, Kang DH. Rapid enumeration of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted milk formula by fluorogenic most-probable-number assay using 96-well microtiter plate. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology.* 2005;13;318-328.
26. Nineham AW. The chemistry of formazans and tetrazolium salts. *Chem. Rev.* 1955;55(2);355-483.
27. Smith JJ, McFeters GA. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl

- tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods*. 1997;26;161-175.
28. Maldonado F, Packard TT, Gómez M. Understanding tetrazolium reduction and the importance of substrates in measuring respiratory electron transport activity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2012;434-435;110-118.
29. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 1996;4;14-19.
30. McCluskey C, Quinn JP, McGrath JW. An evaluation of three new generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microbial ecology*. 2005;49;379-387.
31. Tsukatani T *et al.* Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;75;109-116.
32. Grare M *et al.* Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How? *Journal of Microbiological Methods*. 2008;75;156-159.
33. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;72;157-165.
34. Haines JR *et al.* Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. *Journal of Industrial Microbiology*. 1996;16;36-41.

35. Heidelberg JF *et al.* Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63(9);3585-3588.
36. Vallejo VE, Yanine H, Roldán FA. Aplicación de sales de tetrazolio de nueva generación (XTT) para la estimación de la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos empleando la técnica del número más probable. *Acta Biol. Colomb.* 2010;15(3);75-90.
37. Dinamarca MA, Cereceda-Balic F, Fadic X, Seeger M. Analysis of s-triazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration and tetrazolium-salt detection. *Int. Microbiol.* 2007;10;209-215.
38. Baird RM, Hodges NA, Denyer SP. Handbook of microbiological quality control, pharmaceuticals and medical devices. Great Britain, 2000. Taylor & Francis. pp 54-64.
39. Easter MC. Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry. United States, 2003. Interpharm/CRC Press. pp 31-35, 41-43.
40. Barrientos-Hernández F. Evaluación de la actividad antimicrobiana de tres sanitizantes usados en los laboratorios de Microbiología general II y Laboratorio I planta alta de la UMIEZ de la FES Zaragoza [Tesis]. México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM; 2013.
41. Bartlett RC, Mazens M, Greenfield B. Acceleration of tetrazolium reduction by bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1976;3(3);327-329.
42. Tengerdy RP, Nagy JG, Martin B. Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. *Applied Microbiology.* 1967;15(4);954-955.

43. Bhupathiraju VK, Hernández M, Landfear D, Alvarez-Cohen L. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 1999;37;231-243.

**Anexo 1. Análisis microbiológico de productos farmacéuticos por el método del número más probable.** (Extraído del MGA 0571 Límites Microbianos)<sup>7</sup>

**Método del número más probable.**

La precisión y exactitud de este método es menor que el de filtración o del recuento en placa, los resultados no son confiables particularmente para el recuento de hongos. Por esta razón el método del NMP se reserva para enumerar organismos mesofílicos aerobios cuando no se puede usar otro método.

Si su uso se justifica proceder como sigue: Preparar 3 diluciones decimales seriales del producto como se describe en "*Preparación de la muestra*" y en "*Neutralización o eliminación de la actividad antimicrobiana*". De cada dilución, tomar 3 alícuotas de 1 g ó 1 mL para inocular 3 tubos con 9 ó 10 mL de caldo soya tripticaseína. Si es necesario, añadir al medio un agente tensoactivo como el polisorbato 80 y un inactivador antimicrobiano.

Para la prueba de aptitud del método, incubar los tubos de 30 a 35 °C por no más de 3 días; para el análisis del producto incubar los tubos de 30 a 35 °C por un periodo de 3 a 5 días. Leer los tubos por turbiedad, si la lectura se dificulta por la naturaleza del producto, subcultivar en el mismo caldo, incubar durante 1 a 2 días en las mismas condiciones y leer por turbiedad. Determinar el número más probable de microorganismos por gramo o mililitro del producto de prueba en la *tabla 0571.3*.

**Anexo 2. Tabla 0571.3. Número más probable de microorganismos.**

Combinaciones de tubos con crecimiento en cada dilución			Número más probable de microorganismos por gramo o por mililitro (NMP/g o NMP/mL)	Límites de confianza al 95 %
Número por gramos o mililitro de producto por tubo				
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>		
0.1	0.01	0.001		
0	0	0	< 3	0 a 9.4
0	0	1	3	0.1 a 9.5
0	1	0	3	0.1 a 10
0	1	1	6.1	1.2 a 17
0	2	0	6.2	1.2 a 17
0	3	0	9.4	3.5 a 35
1	0	0	3.6	0.2 a 17
1	0	1	7.2	1.2 a 17
1	0	2	11	4 a 35
1	1	0	7.4	1.3 a 20
1	1	1	11	4 a 35
1	2	0	11	4 a 35
1	2	1	15	5 a 38
1	3	0	16	5 a 38
2	0	0	9.2	1.5 a 35
2	0	1	14	4 a 35
2	0	2	20	5 a 38
2	1	0	15	4 a 38
2	1	1	20	5 a 38
2	1	2	27	9 a 94
2	2	0	21	5 a 40
2	2	1	28	9 a 94
2	2	2	35	9 a 94
2	3	0	29	9 a 94
2	3	1	36	9 a 94
3	0	0	23	5 a 94
3	0	1	38	9 a 104
3	0	2	64	16 a 181
3	1	0	43	9 a 181
3	1	1	75	17 a 199
3	1	2	120	30 a 360
3	1	3	160	30 a 380
3	2	0	93	18 a 360
3	2	1	150	30 a 380
3	2	2	210	30 a 400
3	2	3	290	90 a 990
3	3	0	240	40 a 990
3	3	1	460	90 a 1 980
3	3	2	1 100	200 a 4 000
3	3	3	> 1 100	