

PROCOLOS
**ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICOS
EN LA INDUSTRIA
FARMACÉUTICA**

Inspired by knowledge

TODOS LOS PROCEDIMIENTOS BAJO FARMACOPEA EUROPEA

Índice

| | |
|---|-----------|
| ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE AGUAS _____ | 04 |
| Eur. Pharma 9.0 | |
| ANÁLISIS DE PRODUCTOS ESTÉRILES _____ | 05 |
| Procedimiento acorde Eur. Ph. 2.6.1 | |
| ANÁLISIS DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES | |
| Procedimiento acorde Eur. Ph. 2.6.12 y 2.6.13 | |
| ENUMERACIÓN DE MESÓFILOS TOTALES _____ | 07 |
| <i>ESCHERICHIA COLI</i> _____ | 09 |
| BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS BILI-TOLERANTES _____ | 10 |
| <i>SALMONELLA</i> _____ | 11 |
| <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> _____ | 12 |
| <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> _____ | 13 |
| <i>CLOSTRIDIUM</i> _____ | 14 |
| <i>CANDIDA</i> _____ | 15 |

La industria farmacéutica es uno de los sectores empresariales más influyentes a nivel mundial, constituida por organizaciones públicas y privadas que se dedican de manera exclusiva a la investigación, fabricación, comercialización y distribución de productos químicos farmacéuticos destinados a la salud humana y animal.

La regulación del análisis y control de medicamentos en este sector es de vital importancia tanto en el desarrollo de nuevos fármacos como en el control de los ya existentes con el fin de garantizar la calidad, eficacia y seguridad de los mismos.

La Farmacopea Europea es el instrumento oficial con carácter jurídico en la UE establecido para **garantizar la calidad de este tipo de productos**. Incluye normas de calidad para los principios activos, normas generales para la formulación y normas generales para la fabricación de medicamentos. Está constituida por Comités de Expertos de los países implicados, además, participan otros países en calidad de observadores, junto a la OMS.

Esta normativa contempla, entre otros, el **análisis microbiano** de productos farmacéuticos, materias primas empleadas, agua, aire, equipamiento o material de empaque, vitales para **minimizar el tipo y número de microorganismos presentes**. Aquellos productos de administración parenteral o de uso ocular deben ser estériles.

Un medicamento se considera contaminado cuando sobrepasa un límite de microorganismos patogénicos, oportunistas u objetables, entendiendo éstos como aquellos que tienen la capacidad para limitar la eficacia del producto, cuando presentan metabolitos tóxicos o deterioro físico o químico. La dosis infectiva varía entre especies e incluso entre individuos.



En la presente guía encontrarás los medios de cultivo y procedimientos formulados bajo Farmacopea que necesitas para realizar:

- **Test de productos estériles**
- **Test de productos no estériles**
- **Test de recuento microbiológico**
- **Control microbiológico de aguas**

Control microbiológico de aguas

El agua es la sustancia más utilizada en la industria farmacéutica tanto para la producción; como ingrediente del producto o en alguna de las etapas de elaboración, como para el lavado de equipos. El control microbiológico de la misma es de vital importancia durante la etapa de ingreso a la planta de tratamiento, purificación, almacenamiento y distribución, ya que los microorganismos pueden proliferar a lo largo de cualquier etapa anteriormente descrita, afectando a la calidad de la misma.

Las muestras de agua deben ser analizadas para evitar cambios en el proceso de recuento microbiano. Una vez recogida la muestra, debe ser conservada entre 2 y 10 °C. No se debe exceder las 8 horas hasta efectuar el recuento, y las 30 horas hasta el análisis de bacterias coliformes. Los registros de muestreo, recepción y análisis deben poder demostrar que los tiempos establecidos se cumplen.

Bibliografía

American Public Health Association (1985) *Standard Method for the Enumeration of Water and Wastewater*.
European Pharmacopeia 9.3.



Las aguas para uso farmacéutico pueden clasificarse según el uso y el método de obtención.

- **Agua para inyectables:** cuyo uso es la preparación de medicamentos por vía parenteral cuando el agua es usada como vehículo (agua de inyección en bulk) o como diluyente de sustancias o preparados.
- **Agua purificada:** utilizada para la preparación de medicamentos que requieren esterilidad y apirogenicidad, excepto aquellos autorizados.
- **Agua para preparación de extractos:** para la preparación de extracto de medicamentos.
- **Agua altamente purificada:** cuya finalidad es la preparación de productos medicinales en los cuales se requiere una alta calidad biológica, excepto aquellos en los que se hace uso de agua para inyectables.

AGUA PURIFICADA: 100 UFC/ml

AGUA ALTAMENTE PURIFICADA: 10 UFC/100 ml

Usar al menos 200 ml de muestra

AGUA PARA INYECTABLES: 10 UFC/ 100 ml

Usar al menos 200 ml de muestra

Determinación mediante membrana de filtración con un tamaño de poro no superior a 0.45 µm. Realizar cultivo en Agar R2A (CAT. 1071)

Incubación a 30-35 °C // 5 días

**AGUA PARA PREPARACIÓN DE EXTRACTOS:
100 UFC/100 ml**

Determinación mediante membrana de filtración con un tamaño de poro no superior a 0.45 µm. Realizar cultivo en Agar Soja y Trypticaseína (TSA) (CAT. 1068)

Incubación a 30-35 °C // 5 días

**AGUA PURIFICADA ALMACENADA:
100 UFC/ 100 ml**



Test de esterilidad

Introducción

El ensayo de esterilidad tiene como objetivo verificar la ausencia de contaminación por microorganismos en productos estériles, ya sea porque hayan sido esterilizados o preparados asépticamente. Un resultado satisfactorio indica la ausencia de microorganismos contaminantes en la muestra examinada bajo las condiciones del test. Para lograr tales condiciones, el entorno de las pruebas debe adaptarse a la forma en que se realiza la prueba de esterilidad. Estas condiciones de trabajo se controlan regularmente mediante un muestreo apropiado del área de trabajo.

Este ensayo aparece por primera vez en la Farmacopea británica del año 1932, y más tarde en la Farmacopea de Estados Unidos en el año 1936 para soluciones estériles. A lo largo de los años se han ido realizando cambios constantes que han llevado a perfeccionar las técnicas de detección de la contaminación en este tipo de productos.

Bibliografía

Brewer. JAMA, 115. 1940. Vera. J. Bact. 47:59, 1944. Pittman. J. Bact. 51:19, 1946.
European Pharmacopoeia 9.3.

Test de promoción del crecimiento de aerobios, anaerobios y fungi

| | |
|--|--|
|  BACTERIASAERÓBICAS (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) |  BACTERIAS ANAERÓBICAS (<i>Clostridium sporogenes</i>) |
|--|--|

Inocular en envases separados por microorganismo Medio Líquido Tioglicolato (CAT. 1508) con < 100 UFC de cada una de las especies arriba descritas

| | |
|---|--|
|  BACTERIASAERÓBICAS (<i>Bacillus subtilis</i>) |  FUNGI (<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>) |
|---|--|

Inocular en envases separados por microorganismo Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224) con < 100 UFC de cada una de las especies arriba descritas

Incubar no más de 3 días en el caso de bacterias y no más de 5 días en el caso de hongos y levaduras.

Test de aptitud del método

Este test debe realizarse simultáneamente con el test de esterilidad del producto examinado. Se lleva a cabo cuando hay que hacer un test de esterilidad de un nuevo producto o cuando se cambian las condiciones experimentales del test.

Emplea exactamente el mismo procedimiento utilizado en el test de esterilidad del producto a examinar descrito más abajo excepto por las siguientes modificaciones.

A ENSAYO DE APTITUD DEL MÉTODO POR FILTRACIÓN DE MEMBRANA

- Tras transferir el contenido del envase(s) de los productos a examinar a la membrana de filtración, inocular una pequeña cantidad de microorganismos viables (< 100 UFC) a la cantidad final de diluyente estéril utilizado para enjuagar el filtro

B ENSAYO DE APTITUD DEL MÉTODO POR TRANSFERENCIA DIRECTA

- Tras transferir el contenido del envase(s) de los productos a examinar al medio de cultivo, inocular una pequeña cantidad de microorganismos viables (< 100 UFC)

En ambos casos usar los mismos microorganismos descritos en el test de promoción de crecimiento de aerobios, anaerobios y fungi. Realizar un test de promoción de crecimiento como control positivo. Incubar los envases por un período no superior a 5 días.

Test de esterilidad del producto a examinar

A MÉTODO POR FILTRACIÓN DE MEMBRANA

Producto a analizar:

- Soluciones acuosas
- Sólidos solubles
- Aceites y soluciones oleosas
- Semisólidos (cremas y ungüentos)

B MÉTODO POR TRANSFERENCIA DIRECTA

Producto a analizar:

- Líquidos oleosos
- Semisólidos (cremas y ungüentos)
- Hilo de suturas y productos relacionados para uso veterinario

Incubar los medios inoculados durante 14 días.

Observar durante el tiempo de incubación y una vez ha finalizado el mismo la evidencia macroscópica de crecimiento microbiano. Si el medio se vuelve tan turbio que no permite leer la presencia/ausencia de crecimiento microbiano transferir 1 ml a un nuevo medio e incubar no menos de 4 días.

Si no hay evidencia de crecimiento microbiano el producto cumple con el test de esterilidad.

Test recuento microbiológico

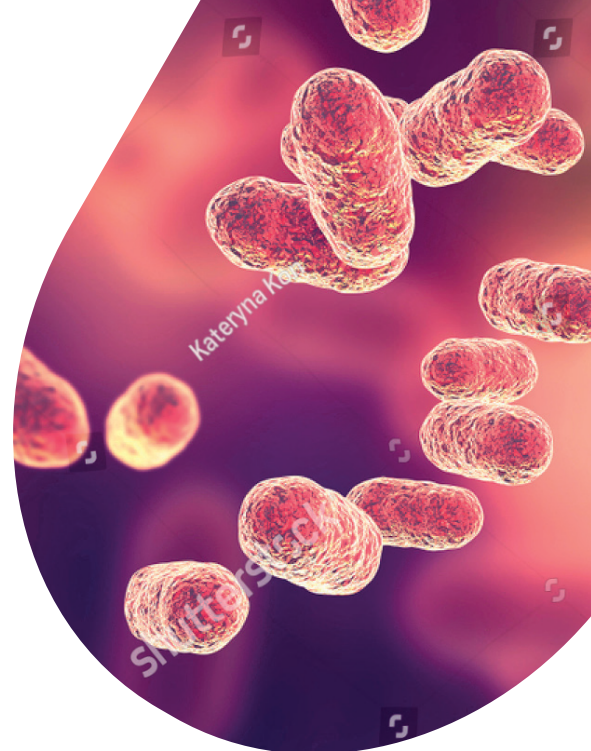
TAMC (Recuento microorganismos aerobios totales) & TYMC (Recuento mohos y levaduras totales)

Los test descritos en esta sección permiten la enumeración cuantitativa de bacterias mesofílicas, recuento de microorganismos totales aerobios (TAMC) y fungi, recuentos de mohos y levaduras totales (TYMC), que pueden crecer bajo condiciones aeróbicas

Bibliografía

Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 11th Edition. APHA., Inc. New York, 1960.

European Pharmacopoeia 9.3.



A - FILTRACIÓN POR MEMBRANA

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra en Agua Peptonada Tamponada (**CAT. 1401**) a pH 7.0 y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes

MICROORGANISMOS TOTALES AEROBIOS

Transferir 10 ml de la solución de stock a la membrana de filtración (tamaño del poro 0.45 µm)

MOHOS Y LEVADURAS TOTALES

Transferir 10 ml de la solución de stock a la membrana de filtración (tamaño del poro 0.45 µm)

Lavar cada membrana de filtración 3 x 100 ml de Agua Peptonada Tamponada (**CAT. 1401**) a pH 7.0

MICROORGANISMOS TOTALES AEROBIOS

Transferir la membrana a una placa de Agar Soja y Tripticaseína (TSA) (**CAT. 1068**)
Incubación a 30-35 °C // 5 días

MOHOS Y LEVADURAS TOTALES

Transferir la membrana a una placa de Agar Dextrosa Sabouraud (**CAT. 1024**)
Incubación a 20-25 °C // 5-7 días

Calcular el número de UFC por gramo o por mililitro de producto

B - MÉTODOS DE RECuento EN PLACA

B.1 MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra en Agua Peptonada Tamponada (**CAT. 1401**) a pH 7.0 y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes

MICROORGANISMOS TOTALES AEROBIOS

Transferir 1 ml de la solución de stock a al menos una placa de Petri vacía y esterilizada. Añadir 15-20 ml de Agar Soja y Tripticaseína (TSA) (**CAT.1068**) a < 45 °C.

Incubación a 30-35 °C // 5 días

MOHOS Y LEVADURAS TOTALES

Transferir 1 ml de la solución de stock a al menos una placa de Petri vacía y esterilizada. Añadir 15-20 ml de Agar Dextrosa Sabouraud (**CAT.1024**) a < 45 °C
Incubación a 20-25 °C // 5-7 días

Seleccionar las placas correspondientes a la dilución dada y que presentan el mayor número de colonias inferior a 250 para TAMC y 50 para TYMC.
Hallar la media aritmética de los recuentos por medio de cultivo.

Calcular el número de UFC por gramo o por mililitro de producto

B - MÉTODOS DE RECuento EN PLACA

B.2 MÉTODO EN SUPERFICIE

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra en Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1401) a pH 7.0 y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes

MICROORGANISMOS TOTALES AEROBIOS

Transferir al menos 0.1 ml de la solución de stock a una placa de Agar Soja y Trypticaseína (TSA) (CAT.1068)
Incubación a 30-35 °C // 120 horas

MOHOSYLEVADURAS TOTALES

Transferir al menos 0.1 ml de la solución de stock a una placa de Agar Dextrosa Sabouraud (CAT.1024)
Incubación a 20-25 °C // 5-7 días

Calcular el número de UFC por gramo o por mililitro de producto.

C - MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (TAMPC)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra en Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1401) a pH 7.0 y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes

Realizar dos diluciones seriadas a partir de la solución de stock de 1 ml / dilución en dos tubos de 9 ml cada uno de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224)

Realizar a partir de las tres diluciones anteriores otras tres diluciones con al menos 3 tubos / dilución en una concentración 1:10 en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224)
Incubación a 30-35 °C/120 horas

Realizar a partir de las tres diluciones anteriores otras tres diluciones con al menos 3 tubos / dilución en una concentración 1:10 en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224)
Incubación a 30-35 °C/ máx. 3 días

CONFIRMACIÓN Tubos con turbidez

Realizar un subcultivo en el mismo caldo o en una placa de Agar Soja y Trypticaseína (TSA) (CAT.1068).
Determinar el número más probable de microorganismos por gramo o mililitro del producto

CONFIRMACIÓN Tubos sin turbidez

Determinar el número más probable de microorganismos por gramo o mililitro del producto



Escherichia coli

Introducción

Se trata de un microorganismo perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo gram-negativo, móvil, no esporulado. Además, es lactosa positivo y oxidasa negativo. *Escherichia coli* se puede distinguir de los demás coliformes por su capacidad para producir indol a partir de triptófano o por la producción de la enzima β -glucuronidasa. Estas características son aprovechadas para el aislamiento selectivo y la confirmación en distintos procesos de análisis.

Es una bacteria ubicua en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a esta alta presencia en el tracto intestinal y heces, es un microorganismo indicador de malas prácticas higiénicas o contaminación fecal durante la fabricación o manipulación de fármacos. Su presencia se utiliza como indicador de que otros organismos patógenos de origen fecal pueden estar presentes, en especial en productos de consumo oral y en materias primas de origen natural.

Hoy en día, las pruebas también contemplan la concentración de *Escherichia coli* según la Farmacopea Europea.

Bibliografía

MacConkey J. H. 5:33. 1905. Joseph Md. State. Dept. Health. Procedures, 1960. *European Pharmacopoeia* 9.3.

Chils, E., and L. A. Allen. 1953. *Improved methods for determining the most probable number of Bacterium coli and of Enterococcus faecalis*. J. Hyg.Camb. 51:468-477.



Método

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra usando al menos 1 g / 1 ml del producto a examinar en Agua Peptonada Tamponada (**CAT. 1401**) y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes.

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

Sembrar 10 ml de la solución de stock o la cantidad correspondiente a 1 g / 1 ml del producto en 100 ml de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) (**CAT. 1224**) y homogeneizar.
Incubación a 30-35 °C // 18-24 horas

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Resembrar 1 ml de Caldo de Soja Tripticaseína en 100 ml de Caldo MacConkey (**CAT. 1210**).
Incubación a 42-44 °C // 24-48 horas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placas de Agar MacConkey (**CAT. 1052**)
Incubación a 30-35 °C // 18-72 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El crecimiento de colonias en el medio indica la posible presencia de *E. coli*. Confirmación mediante test de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias o si los ensayos de identificación son negativos

Bacterias gram-negativas resistentes a las sales biliares

Introducción

Las enfermedades infecciosas han influido de forma determinante en la evolución de la historia del hombre. Son actualmente una de las principales causas de mortalidad en el mundo provocando un número considerable de infecciones.

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una doble membrana celular, una externa y otra citoplasmática, entre las que se encuentra una fina pared de peptidoglicano, que les hace no retener el colorante durante la tinción de Gram. La estructura de la membrana externa comprende una parte exterior constituida por un complejo de lipopolisacáridos cuya parte lipídica actúa como una endotoxina y es responsable de la capacidad patógena del microorganismo. Esta membrana externa las protege de antibióticos como la penicilina, colorantes o detergentes, característica que les permite colonizar medios difícilmente colonizables por otros microorganismos.

Entre las bacterias Gram negativas resistentes a las sales biliares se encuentra *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*.

Bibliografía

ISO 21528. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae.*

ISO 8523 *Microbiology – General guidance for the detection of Enterobacteriaceae with pre-enrichment. European Pharmacopoeia 9.0.*

Mossel D.A.A., Visser M. and Cornelissen A.M.R.J App, Bact. 24:444. 1963.

European Pharmacopoeia 9.3.



Método

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra usando al menos 1 g del producto a examinar en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224) y homogeneizar. Incubación a 20-25 °C // 2-5 horas

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes.

A - TEST DE AUSENCIA DE ENTEROBACTERIAS Y OTRAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

Salvo indicación prescrita, sembrar el volumen correspondiente a un 1 g de producto en 100 ml de Caldo EE Mossel (CAT. 1202). Incubación a 30-35 °C // 24-48 horas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placas de Agar Bilis y Rojo Violeta con Glucosa (VRBG) (CAT. 1092). Incubación a 30-35 °C // 18-24 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El producto satisface el ensayo si no se observa crecimiento de colonias

B - ENSAYO CUANTITATIVO DE ENTEROBACTERIAS Y OTRAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

Preparar tres tubos con diluciones que contengan 0.1 g, 0.01 g y 0.001 g del producto a examinar en 10 ml de Caldo EE Mossel (CAT. 1202). Incubación a 30-35 °C // 24-48 horas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placas de Agar Bilis y Rojo Violeta con Glucosa (VRBG) (CAT. 1092). Incubación a 30-35 °C // 18-24 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El crecimiento de colonias constituye un resultado positivo. Anotar la menor cantidad del producto que da un resultado positivo y la mayor cantidad que da un resultado negativo. Consultar la tabla 2.6.13.2 de la Farmacopea Europea

Salmonella

Introducción

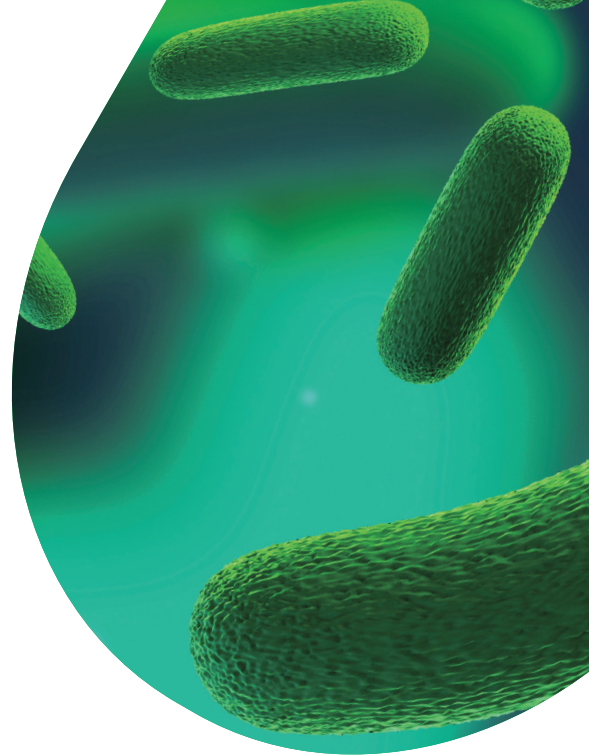
Salmonella es una familia de microorganismos muy diversa, que incluye unos 2.300 serotipos distintos. Es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas. Este grupo de bacterias se presenta en forma de bacilo gram-negativo (ya que pertenecen al enorme grupo de las Enterobacterias), son anaerobias facultativas y móviles mediante flagelos. Además, son fermentadoras de glucosa pero no de lactosa y no producen ureasa.

La salmonelosis se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas en todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones. Esta familia de bacterias es la causa de millones de hospitalizaciones en el mundo, aumentando este número hasta 30 veces si se tuviesen en cuenta aquellas infecciones que no llegan a diagnosticarse, ya que comúnmente puede causar un proceso diarreico normal. Se comporta como un patógeno intracelular facultativo que, dependiendo del serotipo, el inóculo, los factores de virulencia expresados por la cepa, el hospedador involucrado, y el estado inmunológico del paciente puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa hasta una infección sistémica.

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y como flora normal del tracto intestinal de animales y humanos. Se distingue de otros microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales en que su presencia puede ser habitual en materias primas de origen natural, haciendo de vital importancia su investigación en las mismas, en especial aquellas de origen animal.

Bibliografía

Rollender, W. U. Beckford; R.D. Belsky, B. Krostoff (1969) *Comparison of Xylose Lysine desoxycholate agar and MacConkey agar for the isolation of Salmonella and Shigella from clinical specimens* (tech. Bull. Reg. Med. Tech, 39 (1) 8-p).
European Pharmacopoeia. 9.3.



Método

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra usando al menos 10 g/ 10 ml del producto a examinar en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (**CAT. 1224**) y homogeneizar.
Incubación a 30-35 °C // 18-24 horas

El Caldo de Soja Trypticaseína puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes.

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Sembrar 0.1 ml del Caldo de Soja Trypticaseína en 10 ml de Caldo Rappaport Vassidialis (**CAT. 1414**)
Incubación a 30-35 °C // 18-24 horas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placas de Agar XLD (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) (**CAT. 1080**)
Incubación a 30-35 °C // 18-48 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Todas las colonias rojas con/sin núcleo negro son susceptibles de ser *Salmonella*. Confirmación mediante test de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias de los tipos descritos o si son negativos los ensayos de confirmación

Staphylococcus aureus

Introducción

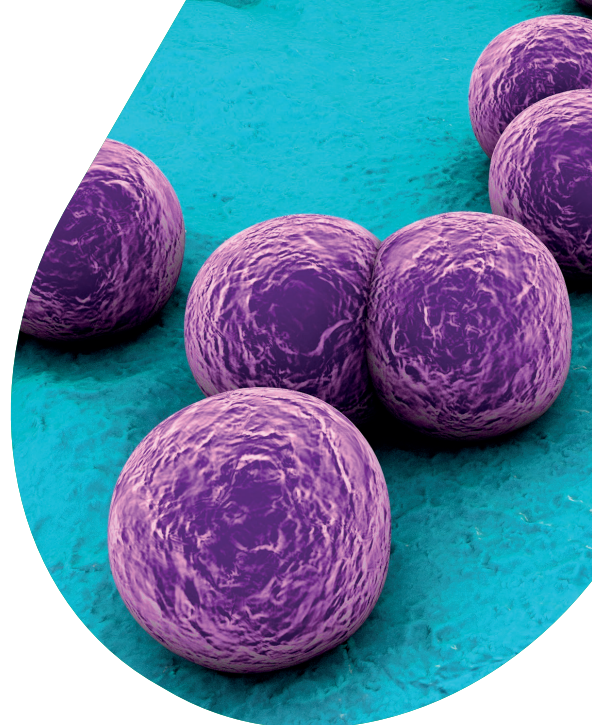
Se trata de una bacteria perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*. Son cocos anaerobios facultativos agrupados en racimos, gram-positivos, inmóviles y no esporulados. Entre sus características más distintivas encontramos la producción de factores de virulencia como coagulasa y catalasa que se utilizan para las pruebas confirmatorias tras el aislamiento. Es un microorganismo ampliamente distribuido a nivel mundial y que actúa como comensal en el epitelio humano y en las mucosas. Lo podemos encontrar con frecuencia en la boca, sangre, glándulas mamarias, intestino, tracto genitourinario y vías aéreas.

Es también un patógeno oportunista, causante de infecciones agudas y piogénicas, que si no son tratadas, pueden extenderse al tejido circundante o por vía de una bacteriemia a otros órganos. Entre los tipos de infecciones causadas por este microorganismo se encuentran la neumonía, osteomielitis y endocarditis aguda entre otras. La presencia del género *Staphylococcus* y particularmente *S. aureus* en una materia prima o producto farmacéutico o cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana, es decir, los operadores. Estos microorganismos pueden ser transportados a través del polvo, la piel, la ropa y las microgotas de humedad que se generan al moverse, hablar y estornudar.

Bibliografía

McColloch Am. J. Vet. Research, 8:173. 1947. Velilla, Faber, and Pelczar Am. J. Vet. Research, 8:275. 1947. Chapman, G.H. 1945 J. Bact. 50:201-203.

European Pharmacopoeia. 9.3.



Método

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra usando al menos 1 g/ 1 ml del producto a examinar en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT.1224) / Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1401) a pH 7.2 y homogeneizar.

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes.

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

Sembrar 10 ml de la solución de stock o la cantidad correspondiente a 1 g/1 ml del producto en 100 ml de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224) y homogeneizar.
Incubación a 30-35 °C // 18-24 horas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placas de Agar Sal y Manitol (MSA) (Medio Chapman) (CAT. 1062)
Incubación a 30-35 °C // 18-72 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El crecimiento de colonias blancas/blancas rodeadas de una zona amarilla indica la posible presencia de *Staphylococcus aureus*. Confirmación mediante test de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias de los tipos descritos o si son negativos los ensayos de confirmación

Pseudomonas aeruginosa

Introducción

Se trata de una bacteria perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Son bacilos rectos o curvos, aerobios estrictos, gram-negativos, móviles y no esporulados. Además, son catalasa positiva, utilizando dicha característica para su posterior identificación. Este grupo de bacterias es capaz de producir distintos pigmentos como la piocianina y uoresceína, por ello, se han desarrollado distintos medios de cultivo para promover la producción de dichos pigmentos y así poder identificar las diferentes especies.

Este microorganismo combina su adaptabilidad a diferentes ecosistemas con una gran variedad de factores de virulencia, y el espectro de enfermedades que puede causar varía desde una infección leve a una sepsis. Durante su mecanismo de acción se adhiere a las células epiteliales mediante un pili polar, y una vez adherido, produce proteasas, hemolisinas, exotoxinas y endotoxinas que dañan los tejidos.

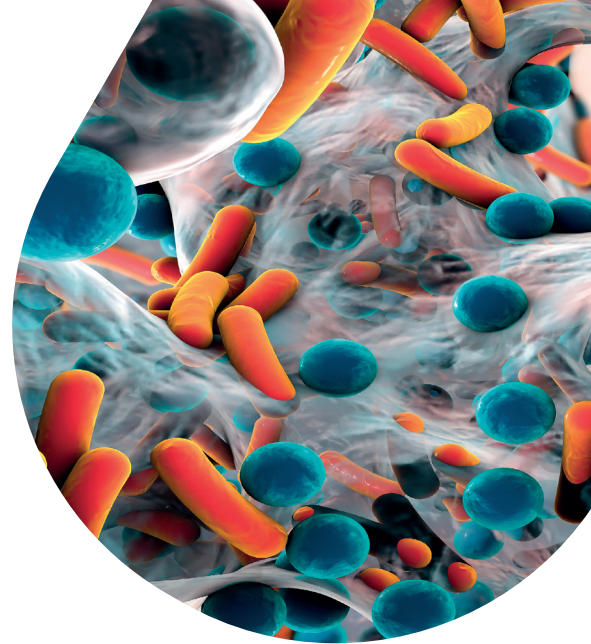
La infección por *P. aeruginosa* está frecuentemente relacionada con la contaminación del agua y soluciones acuosas. Una de las más severas causada por este microorganismo es la endocarditis por administración endovenosa de medicamentos, cuando al ser inyectados al paciente, son disueltos o suspendidos en vehículos acuosos. De ahí la importancia de detectar su presencia en productos farmacéuticos que van a ser administrados por vía inhalatoria y ocular o en vehículos acuosos. Los cosméticos también pueden ser susceptibles de este tipo de contaminación, en especial líquidos y cremas.

Además, puede colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de biofilms, estructuras muy difíciles de eliminar con el uso de agentes salinizantes. Su notable resistencia a los antimicrobianos constituye una de las mayores preocupaciones a nivel mundial.

Bibliografía

King, Ward and Raney. J. Lab. and Clin. Med. 44:301. 1954.
Brown and Lowbury. J. Clin. Path. 18:752. 1965. Lowbury.
J. Clin. Path. 4:66. 1951. Lowbury and Collins. J. Clin. Path.
8:47. 1955.

European Pharmacopoeia. 9.3.



Método

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra usando al menos 1 g del producto a examinar en Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1401) a pH 7 y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes.

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

Sembrar 10 ml de la solución de stock o la cantidad correspondiente a 1 g/1 ml del producto en 100 ml de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224) y homogeneizar.
Incubación a 30-35 °C // 18-24 horas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placas de Agar Cetrimida (CAT. 1102)
Incubación a 30-35 °C durante 18-72 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El crecimiento de colonias en el medio indica la posible presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Confirmación mediante test de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias o si son negativos los ensayos de confirmación

Clostridia

Introducción

Son una clase de bacterias pertenecientes a la clase del filo Firmicutes. Se caracterizan por ser bacilos anaerobios mayormente Gram positivos. La mayoría de los géneros no forman esporas, pero algunos sí, como *Clostridium*, uno de los más conocidos.

Estas bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, principalmente en el suelo y en el trasto intestinal de muchas especies animales, incluida el hombre, donde además las podemos encontrar como flora normal en la piel y mucosas de la nasofaringe, orofaringe, boca, uretra y vagina. Pueden causar infecciones tanto de origen endógeno como exógeno, afectando a cualquier región del cuerpo, siempre que las condiciones en los tejidos sean favorables. Están fundamentalmente involucradas en abscesos de cualquier órgano, colitis, apendicitis, bacteriemia, otitis media crónica, celulitis crepitante, infecciones dentales y orales, endocarditis y endometritis.

La presencia de microorganismos anaerobios especialmente los pertenecientes al género *Clostridium* suele encontrarse en materias primas de origen natural, talco, almidón, etc. Y también en hierbas medicinales y medicamentos fitoterapéuticos.

Bibliografía

Ellner, Stossel, Drakeford and Vasi. AM J. Clin. Path. 45:502-504. 1966.

European Pharmacopoeia. 9.3.



Método

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra usando al menos 2 g/2 ml del producto a examinar en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224) / Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1401) a pH 7.2 y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes.

INACTIVACIÓN DE ESPORAS

Dividir la muestra en 2 tubos de al menos 10 ml. Calentar 1 porción a 80 °C / 10 min y enfriar rápidamente. No calentar la otra porción.

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

Sembrar 10 ml, por separado, de cada una de las porciones de la solución de stock en 100 ml de Medio Reforzado para Clostridium (CAT. 1007). Incubación a 30-35 °C // 48 horas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placa de Agar Columbia (CAT. 1104) Incubación en condiciones anaerobias a 30-35 °C durante 48-72 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El crecimiento de colonias (con/sin esporas) dan una reacción negativa a la catalasa que indica la presencia de Clostridios. Confirmación mediante test de identificación

Candida albicans

Introducción

Se trata de levaduras pertenecientes a la familia de *Saccharomycetaceae* y al género *Candida*. Estos hongos se desarrollan de forma unicelular y son saprófitos del ser humano. Es muy común encontrarlas en las cavidades orales, tracto gastrointestinal y zona vaginal. Aunque tienen una función muy importante en la fermentación de determinados azúcares para el organismo, hay veces que este microorganismo actúa como patógeno oportunista, pudiendo causar candidiasis superficial o sistémica en personas debilitadas, en recién nacidos y en ancianos con sistema inmunológico deficiente.

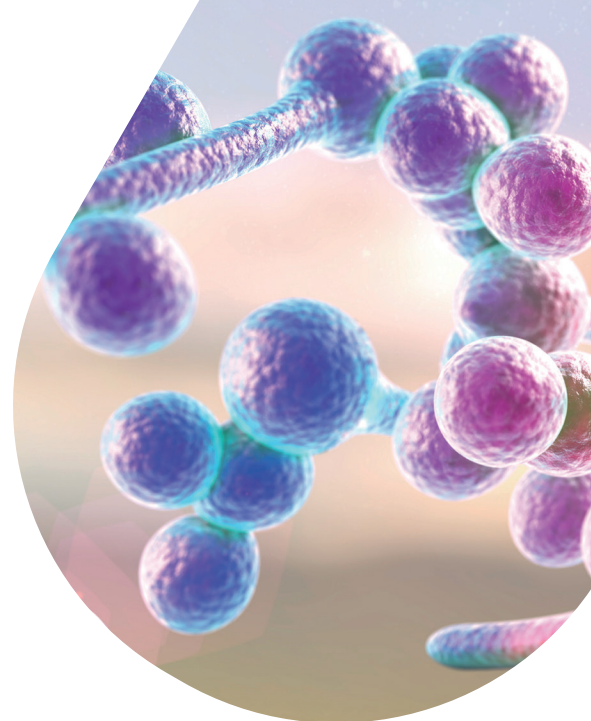
Los productos más susceptibles a la contaminación fúngica son las soluciones oftálmicas, ungüentos, supositorios, pomadas y en cosméticos, jabones, talcos, y otros que contienen nutrientes ricos en hidratos de carbono y ácidos grasos.

Por esto último es necesario analizar estos productos farmacológicos con el objetivo de identificar la presencia de dicho microorganismo y así evitar las consecuencias de una posible infección por *C. albicans* en el consumidor.

Bibliografía

Beuchat, L.R., J.E Corry, A.D King, Jr. And J.I Pitt (ed) 1986) *Methods for the mycological examination of food*. Plenum Pres, New York European Pharmacopoeia. 9.3.

Sabouraud, Ann. *Dermat and Syphilol* 1892-3. Gerog J. Lab. Clin. Med. 67;355 1953.



Método

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En una concentración 1:10 preparar la muestra en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (CAT. 1224) / Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1401) a pH 7.2 y homogeneizar

Esta solución de stock puede suplementarse con neutralizantes y surfactantes.

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

Sembrar 10 ml de la solución de stock o la cantidad correspondiente a 1 g/1 ml del producto en 100 ml de Caldo Dextrosa Sabouraud (CAT. 1205) y homogeneizar.
Incubación a 30-35 °C // 3-5 días

ASLAMIENTO SELECTIVO

Realizar subcultivos en placas de Agar Dextrosa Sabouraud (CAT. 1024)
Incubación a 30-35 °C // 24-48 horas

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El crecimiento de colonias blancas en el medio indica la posible presencia de *Candida albicans*. Confirmación mediante test de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan dichas colonias o si son negativos los ensayos de confirmación



Condalab

Inspired by knowledge

export@condalab.com | www.condalab.com