

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Estudio microbiológico de medicamentos no estériles de
administración oral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Luisa García Arribas

Madrid, 2015

María Luisa García Arribas

TP
1984
168



x-53-223688-1

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS NO ESTERILES DE ADMINISTRACION ORAL.

Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1984



Colección Tesis Doctorales. Nº 168/84

© María Luisa García Arribas
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-20369-1984

Autor: M^a. LUISA GARCIA ARRIBAS

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS NO ESTERILES DE
ADMINISTRACION ORAL.

Director: Dña. M. de los Angeles Mosso Romeo
Doctora en Farmacia, Profesor Adjunto del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología

1 9 8 1

A mis padres

ELISEO GASTON DE IRIARTE Y SANCHIZ, CATEDRATICO DE
MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

HAGO CONSTAR:

Que Dña. María Luisa García Arribas
ha realizado en el Departamento de Microbiología
de la Facultad de Farmacia de la Universidad Com-
plutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra.
Dña. M. de los Angeles Mosso Romeo y la Co-di-
rectora Dra. Dña. M. del Carmen de la Rosa Jorge,
el trabajo que presenta para optar al Grado de
Doctor en Farmacia, con el título: "Estudio micro-
biológico de medicamentos no estériles de adminis-
tración oral".

Y para que conste, firmo la presente
en Madrid a quince de Marzo de mil novecientos
ochenta y uno.

Fdo.: Dr. D. Eliseo Gastón de
Iriarte y Sanchíz

Fdo.: Dra. Dña. M. de los Angeles
Mosso Romeo

Fdo.: Dra. Dña. M. Carmen de la Rosa Jorge.

II

Deseo expresar mi gratitud y agradecimiento a todas aquellas personas que con su colaboración hicieron posible la realización de esta Tesis:

Al profesor Dr. D. Eliseo Gastón de Iriarte y Sanchiz, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia, quien me propuso el tema de Tesis y me facilitó los medios para su realización. Quiero manifestar mi sincera gratitud por el continuo interés que ha mostrado durante la realización de este trabajo.

Al Dr. D. César Nombela Cano, Profesor Agregado de la Cátedra de Microbiología, por sus acertadas orientaciones y consejos.

A la Dra. Dña. M. de los Angeles Mosso Romeo, Directora de esta Tesis, que me inició en este campo de la Microbiología y a quien deseo expresar mi sincero reconocimiento por su ayuda y dedicación durante la realización.

A la Dra. Dña. M. del Carmen de la Rosa Jorge, Co-directora de esta Tesis, mi sincero agradecimiento por sus valiosas enseñanzas y el interés que siempre ha mostrado.

A todos los miembros del Departamento, por su apoyo y colaboración.

A los laboratorios farmacéuticos que amablemente me facilitaron las muestras de medicamentos necesarios, para la realización de la parte experimental.

A la Srta. M. Dolores Dorado Polo, por el trabajo de mecanografía de estas páginas.

A todas las personas que con su comprensión y paciencia han colaborado en mi formación.

III

I N D I C E

CAPITULO I. - INTRODUCCION

	Pág.
1.1. IMPORTANCIA DE LA CONTAMINACION MICROBIOLOGICA EN LOS PREPARADOS FARMACEUTICOS-----	2
1.2. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LOS MICROORGANISMOS EN LOS MEDICAMENTOS-----	4
1.2.1. Alteraciones de los caracteres organolépticos-----	4
1.2.2. Alteraciones en la estabilidad-----	5
1.2.3. Alteraciones en la actividad del medicamento-----	6
1.3. YATROGENIA DESENCADENADA A PARTIR DE CONTAMINACIONES MICROBIOLOGICAS-----	7
1.4. FUENTES PRIMARIAS DE CONTAMINACION---	11
1.4.1. Materias primas-----	12
1.4.1.1. Materias primas como principio activo-----	14
1.4.1.2. Materias primas auxiliares---	15
1.4.2. Agua-----	18
1.4.3. Proceso de fabricación-----	23
1.4.3.1. Condiciones higiénicas del personal-----	26
1.4.3.2. Locales de trabajo y superficies-----	28

	Pág.
1. 4. 3. 3. Forma farmacéutica y formulación-----	31
1. 4. 3. 4. Envases-----	31
1. 4. 3. 5. Almacenamiento-----	33
1. 5. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE LA CONTAMINACION-----	33
1. 5. 1. Ambiente de trabajo-----	33
1. 5. 2. Proceso de fabricación-----	34
1. 5. 3. Envasado y almacenamiento-----	35
1. 5. 4. Conservadores-----	37
1. 5. 5. Condiciones ambientales relacionadas con el microorganismo-----	41
1. 5. 5. 1. Temperatura-----	41
1. 5. 5. 2. pH-----	42
1. 5. 5. 3. Presión osmótica-----	43
1. 5. 5. 4. Actividad de agua (aw)-----	43
1. 6. MICROBIOLOGIA DE LOS PREPARADOS FAR- MACEUTICOS DE VIA ORAL-----	45
1. 7. METODOLOGIA-----	50
1. 8. NORMATIVA Y RECOMENDACIONES-----	53
1. 9. OBJETO DEL TRABAJO-----	64
<u>CAPITULO II. - MATERIALES Y METODOS</u>	
2. 1. MATERIALES-----	67

	Pág.
2.1.1. Material experimental-----	67
2.1.2. Aparatos-----	67
2.2. MEDIOS DE CULTIVO-----	68
2.2.1. Medios para recuento-----	68
2.2.2. Medios para aislamiento-----	69
2.2.3. Medios para la investigación de microor- ganismos patógenos-----	71
2.2.4. Medios para la identificación de <u>Bacillus</u> ----	76
2.2.5. Medios para la identificación de <u>Micrococcus</u> y <u>Staphylococcus</u> -----	80
2.2.6. Medios para la identificación de <u>Streptoco- ccus</u> -----	84
2.3. SOLUCIONES, REACTIVOS Y VARIOS-----	87
2.4. METODOS-----	92
2.4.1. Toma de muestra-----	92
2.4.2. Preparación de la muestra-----	93
2.4.3. Determinación del pH-----	93
2.4.4. Recuento del número de microorganismos---	94
2.4.4.1. Método de recuento por dilución en placa-----	94
2.4.4.1.1. Recuento de bacterias via- bles aerobias mesófilas----	94
2.4.4.1.2. Recuento de bacterias espo- ruladas aerobias mesófilas---	95
2.4.4.1.3. Recuento de bacterias anae- robias mesófilas-----	95
2.4.4.1.4. Recuento de bacterias espo- ruladas anaerobias mesófilas	95

VI

	Pág.
2.4.4.1.5. Recuento de mohos y levaduras-----	95
2.4.4.2. Método del número más probable-----	96
2.4.4.2.1. Recuento de bacterias viables aerobias mesófilas---	96
2.4.4.2.2. Recuento de bacterias esporuladas aerobias mesófilas--	96
2.4.4.3. Método de filtración a través de membrana-----	96
2.4.4.3.1. Recuento de bacterias viables aerobias mesófilas----	97
2.4.4.3.2. Recuento de bacterias esporuladas aerobias mesófilas--	97
2.4.4.3.3. Recuento de bacterias anaerobias mesófilas-----	97
2.4.4.3.4. Recuento de bacterias esporuladas anaerobias mesófilas---	98
2.4.4.3.5. Recuento de mohos y levaduras-----	98
2.4.5. Investigación de microorganismos patógenos-----	98
2.4.5.1. <u>Escherichia coli</u> -----	98
2.4.5.2. <u>Salmonella</u> y <u>Shigella</u> -----	99
2.4.5.3. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> -----	99
2.4.5.4. <u>Staphylococcus aureus</u> -----	100
2.4.5.5. <u>Streptococcus faecalis</u> -----	100
2.4.6. Aislamiento de microorganismos-----	101
2.4.6.1. Microorganismos aerobios-----	101
2.4.6.2. Microorganismos anaerobios----	101
2.4.6.3. Aislamiento de mohos y levaduras-----	101

VII

	Pág.
2.4.7. Identificación de los microorganismos----	102
2.4.7.1. <u>Bacillus</u> -----	102
2.4.7.2. Cocos Gram-positivos-----	107
2.4.7.2.1. Familia <u>Micrococaceae</u> ---	108
2.4.7.2.1.1. <u>Micrococcus</u> -----	110
2.4.7.2.1.2. <u>Staphylococcus</u> -----	112
2.4.7.2.2. <u>Streptococcus</u> -----	113
2.4.7.3. Hongos-----	115

CAPITULO III . - RESULTADOS

3.1. CONTAMINACION MICROBIANA DE LOS MEDICAMENTOS-----	119
3.2. RELACION DEL GRUPO TERAPEUTICO CON LA CONTAMINACION MICROBIANA-----	147
3.3 RELACION DEL PH Y LA CONTAMINACION MICROBIANA-----	148
3.4. RELACION DE LOS METODOS DE RECuento CON LA DETECCION DE LA CONTAMINACION MICROBIANA-----	149
3.5. GRADO DE CONTAMINACION MICROBIANA DE LAS FORMAS FARMACEUTICAS-----	151
3.5.1. Bacterias aerobias-----	151
3.5.2. Bacterias anaerobias-----	152
3.5.3. Mohos y levaduras-----	153
3.5.4. Presencia de contaminación microbiana en las formas farmacéuticas sólidas y líquidas-	153

VIII

	Pág.
3. 6. GRADO DE HOMOGENEIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS MEDICAMENTOS-----	169
3. 7. MEDICAMENTOS NO ACEPTADOS EN FUNCIÓN DE DIFERENTES CIFRAS LÍMITES DE MICROOR- GANISMOS-----	170
3. 8. MICROORGANISMOS AISLADOS DE LOS MEDICA- MENTOS-----	172
3. 8. 1. Identificación de bacterias-----	172
3. 8. 2. Identificación de mohos y levaduras-----	173
3. 8. 3. Distribución de las cepas de microorganismos en las formas farmacéuticas-----	194
CAPITULO IV. - DISCUSION-----	199
CAPITULO V. - CONCLUSIONES-----	227
RESUMEN-----	231
BIBLIOGRAFIA-----	234

1

I INTRODUCCION

1. 1. IMPORTANCIA DE LA CONTAMINACION MICROBIOLÓGICA EN LOS PREPARADOS FARMACÉUTICOS.

La Organización Mundial de la Salud, define el "medicamento" como: toda sustancia o mezcla de sustancias, fabricada, vendida, puesta a la venta o recomendada para: 1º) el tratamiento, el alivio, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, de un estado físico anormal o de los síntomas de una u otra en el hombre o en los animales; o 2º) el restablecimiento, la corrección o la modificación de funciones orgánicas en el hombre o en los animales (155).

La legislación vigente en nuestro país, considera "medicamentos" las sustancias simples o compuestas preparadas y dispuestas para su uso medicinal inmediato, tanto si proceden de los reinos animal, vegetal o mineral; como si se trata de agentes biológicos o productos sintéticos, tengan o no el carácter de especialidad farmacéutica, bien sean destinados a la medicina humana o a la veterinaria (28). Se considera "Especialidad farmacéutica", todo medicamento, alimento-medicamento, productos higiénicos o desinfectantes de composición conocida y denominación especial, dispuesto en envase uniforme y precintado para la venta al público, que haya sido inscrito en el correspondiente registro farmacéutico y autorizado su propietario para la preparación y venta (28). Se entiende por "Forma farmacéutica", la disposición individualizada a que se adaptan los medicamentos para su correcta y eficaz administración (28).

La calidad microbiológica de los medicamentos, ha adquirido gran interés en estos últimos años, no sólo para los preparados farmacéuticos obligatoriamente estériles, sino también para los que no lo son. Diversos autores se han ocupado de este tema (66)(67)(68)(141)(192).

Se consideran medicamentos obligatoriamente estériles los

inyectables, transfusiones intravenosas, soluciones de diálisis, preparados oftálmicos, implantes, injertos, hemostáticos absorbibles. También debe de ser estéril el material de uso médico-farmacéutico, como jeringuillas, agujas hipodérmicas y de sutura, espátulas, lancetas de presoras, sondas y catéteres, equipos de administración de soluciones y extracciones de sangre y cualquiera otros similares (29). A todos estos se les exige una ausencia total de microorganismos y de sustancias pirógenas y deben someterse a una legislación específica según las farmacopeas de diferentes países.

En el momento actual, el contenido de microorganismos en los medicamentos no obligatoriamente estériles, también es motivo de preocupación para la profesión farmacéutica. A partir de 1963, su importancia se puso de manifiesto por la aparición de accidentes terapéuticos provocados por la administración de formas farmacéuticas de vía oral y tópica, que presentaban contaminación por microorganismos patógenos.

Anteriormente la calidad farmacéutica de los medicamentos se limitaba a la conformidad de todos los componentes, según la Farmacopea. Hoy día, esta calidad ha de atender a aspectos más amplios como son: analíticos, galénicos, toxicológicos, farmacológicos y microbiológicos.

Garantizar una calidad microbiológica en los medicamentos es de gran trascendencia e indispensable por dos razones:

- Desde el punto de vista económico puede representar grandes pérdidas para la industria farmacéutica, debido a la producción a gran escala y al largo período de distribución a que se somete el medicamento hasta su administración. En el caso de que haya un alto contenido en microorganismos, estos pueden ocasionar alteraciones en la estabilidad del producto y en ocasiones, estos riesgos son mayores que si la preparación es extemporánea en la oficina de farmacia o en la farmacia hospitalaria.

- En el aspecto sanitario la administración de medicamentos contaminados puede originar graves consecuencias, con riesgo de infección si la capacidad de resistencia del individuo se ve vencida por la patogenicidad de los microorganismos presentes. No cumpliendo así la finalidad curativa que el medicamento persigue, ya que podría dar lugar a procesos sobreañadidos al padecimiento del individuo.

En todos aquellos preparados farmacéuticos en que no se indique, de una forma clara en su composición, el contenido de microorganismos, como es el caso de las vacunas, éstos pueden ser considerados siempre como elementos extraños (41).

La industria farmacéutica debe conseguir un alto nivel de calidad en la producción de medicamentos para evitar errores y contratiempos que pueden incidir sobre la salud de la población. Por esto, es necesario una atenta vigilancia y control de todos los procesos de fabricación para evitar al máximo los riesgos de contaminación microbiológica en los preparados farmacéuticos (90) (155).

1. 2. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LOS MICROORGANISMOS EN LOS MEDICAMENTOS.

Dentro de los diversos preparados farmacéuticos hay algunos que por su propia naturaleza no van a sufrir ningún tipo de alteración, sin embargo esto no quiere decir, que no sean portadores de microorganismos patógenos o saprofitos.

En los medicamentos se pueden producir alteraciones que afectan: a sus caracteres organolépticos, estabilidad y a la actividad de dicho medicamento.

1. 2. 1. ALTERACIONES DE LOS CARACTERES ORGANOLEPTICOS.

Varian según el tipo de forma farmacéutica:

- En las formas líquidas puede haber producción de sedimen-

to, turbidez y formación de velo. En los jarabes, incluso, se pueden presentar cambios en la viscosidad. También puede haber formación de gas en aquellos preparados farmacéuticos que contienen carbohidratos y que fundamentalmente es producido por las levaduras (25).

- En las formas sólidas puede haber cambios en la coloración, bien por el propio microorganismo contaminante que sea pigmentado o por la reacción de éstos con los principios activos del medicamento, que originan: cambios de pH e hidrólisis de los principios activos (alcaloides y glucósidos). Así Mosso y colaboradores (144), en un estudio realizado sobre formas farmacéuticas alcalinas, pusieron de manifiesto el ennegrecimiento en este tipo de preparados, como consecuencia del metabolismo del microorganismo con el principio activo.

-- Cambios en el olor originados por el metabolismo microbiano:

Pueden producirse olores a: SH_2 , ácidos grasos, pescado por producción de aminas, húmedo debido a los mohos, alcohol por la fermentación de los azúcares. Es bastante difícil identificar claramente cuales son las causas responsables de los diferentes olores que se pueden producir.

-- Cambios en la textura que fundamentalmente se pueden producir en los preparados de uso tópico como: pomadas y cremas donde la presencia de microorganismos puede originar grumos. También en los preparados líquidos se pueden producir cambios de viscosidad.

-- Cambios de sabor originados por los metabolitos producidos por el metabolismo microbiano.

1.2.2. ALTERACIONES EN LA ESTABILIDAD.

La mayoría son debidas a la actividad enzimática de bacterias, mohos y levaduras. El metabolismo de los microorganismos origina profundos cambios, por las múltiples y complejas reacciones químicas.

micas que se producen en poco tiempo. Los enzimas segregados originan procesos de: hidrólisis, deshidratación, reducción, oxidación, descarboxilación, desaminación y fosforilación. El resultado final es la acumulación de metabolitos diversos que dan lugar a modificaciones importantes del medio y a la degradación de los principios activos. En algunos preparados durante su proceso de almacenamiento, puede haber una excesiva producción de gas y originar explosiones.

Hay preparados farmacéuticos como las pomadas y emulsiones, que pueden perder su estabilidad por hidrólisis de la fase oleosa, variación del pH en la fase acuosa, o por producirse una degradación del emulgente. En estos casos se produce la ruptura del equilibrio, y se origina una separación de las fases que forman la emulsión.

1. 2. 3. ALTERACIONES EN LA ACTIVIDAD DEL MEDICAMENTO.

Podemos citar algunos casos en que la actividad del medicamento se puede ver alterada por la presencia de microorganismos. Los preparados farmacéuticos a base de penicilina pueden sufrir modificaciones de su actividad por la presencia de microorganismos productores de penicilinasas.

La especie Proteus vulgaris puede degradar moléculas del antibiótico (penicilina) y colorantes (tartrazina) (172). Los microorganismos de origen fecal son capaces de transformar el lanatóxido A en digitoxina (172). También se produjo la descomposición del pirimidón por bacterias (139).

Hay que tener en cuenta que los microorganismos pueden utilizar diferentes vías metabólicas, en función de las condiciones del medio en que se encuentren. Bean y colaboradores (18) señalan que el Enterobacter aerogenes, ataca el ácido pirúvico a pH 8 con formación de ácido fórmico y acético, mientras que a pH 6 el ácido pirúvico sólo se descarboxila.

En ciertas condiciones los microorganismos pueden oxidar

los fenoles a pH de 7 a 8 (18). También hay modificaciones de pH provocadas por los microorganismos al atacar los componentes del medicamento por destrucción de los aminoácidos. Si el pH es demasiado alcalino, hay una liberación del ión amonio y originan un producto de carácter ácido. Si el pH es demasiado ácido, hay liberación de anhídrido carbónico por descarboxilación, y se acumulan productos de reacción alcalina (aminas) (18).

Los medicamentos que lleven incorporadas sustancias antimicrobianas, si tienen una fuerte contaminación microbiológica pueden originar una disminución en la concentración mínima inhibitoria de estas sustancias, que actúan contra los microorganismos presentes en el medicamento.

1.3. YATROGENIA DESENCADENADA A PARTIR DE CONTAMINACIONES MICROBIOLÓGICAS.

El empleo de la palabra yatrogenia, lo creemos justificado en este caso, ya que la nueva enfermedad infecciosa producida, nunca se hubiera desencadenado a no ser por la administración de un medicamento, que en su formulación era correcto, pero que al recibir un determinado tratamiento adicional ha ido paulatinamente convirtiéndose en un preparado que arriesga, no sólo la posibilidad del restablecimiento de la salud, sino incluso produce una nueva enfermedad.

La presencia de una determinada micropoblación normal en el huésped, juega un importante papel en su equilibrio fisiológico, ya que constituye una barrera defensiva para el establecimiento de microorganismos patógenos. Es necesario que exista un equilibrio entre: las diferentes especies microbianas, que componen la micropoblación autóctona y el huésped.

Sin embargo este equilibrio se puede romper por disminución de las defensas del huésped o por modificación de su micropoblación.

Cuando un microorganismo logra penetrar en los tejidos del huésped y multiplicarse en ellos, el proceso recibe el nombre de infección, que puede ser inaparente o clínica.

Las manifestaciones clínicas que aparecen en el huésped producidas por medicamentos contaminados con microorganismos, pueden variar según:

- El estado fisiológico del paciente.
- La vía de administración del medicamento.
- El poder patógeno y número de microorganismos presentes en el medicamento contaminado, sus toxinas y productos metabólicos nocivos.

La importancia de los accidentes provocados por la administración de medicamentos, de vía oral, conteniendo microorganismos patógenos, ya fue puesta de manifiesto en nuestro país, en 1958 por el Prof. Gastón de Iriarte. El cual señaló que, jarabes, comprimidos y grageas que se habían contaminado de forma experimental en el laboratorio, por neumococos, bacilos de Koch y otros microorganismos; eran capaces de infectar y desarrollar un proceso patológico en los animales de experimentación a los que se había administrado (91).

Algunas especies microbianas, están dotadas de un elevado poder de síntesis que las permite multiplicarse en medios pobres, en condiciones adversas y en competencia con otros microorganismos. El caso más destacado es el de Pseudomonas aeruginosa, que dispone de un equipo enzimático muy amplio, éste le permite utilizar diferentes sustratos para su supervivencia y desarrollarse en muchas sustancias medicamentosas. Otras de las características más destacadas es que tiene gran resistencia a las sustancias antimicrobianas. En los casos extremos se multiplica en soluciones antisépticas, utilizando el agente antimicrobiano como fuente de carbono. Al desarrollarse en distintos desinfectantes, antisépticos y en soluciones de ésteres de para hidroxibenzoico, este microorganismo ha desempeñado un papel muy significativo

como patógeno nosocomial (1) (6) (21) (107) (109) (163).

Aunque este microorganismo no se encuentra frecuentemente en piel, ni en heces de personas normales y sólo de manera ocasional se aísla del aire (5), en las personas hospitalizadas se favorece la implantación por tener las defensas disminuídas. Recientemente se han presentado problemas de infecciones hospitalarias producidas por este microorganismo, debido a la selección producida por la gran utilización de antibióticos. También se ha encontrado en agua destilada que permaneció almacenada con tapones de corcho y en soluciones jabonosas y antisépticas que contenían sales de amonio cuaternario, incluso cuando su almacenamiento se realizó a 42°C (5) (104). Algunas especies de Pseudomonas son capaces de atravesar las membranas filtrantes de 0,45 micras de diámetro, como es el caso de Pseudomonas diminuta (41).

Por estas características se encuentran descritos muchos accidentes provocados por Pseudomonas, siendo el contaminante aislado con mayor frecuencia en los medicamentos. Su presencia es más peligrosa en preparados líquidos y pomadas, porque el agua es un factor que favorece su desarrollo (70). Plotkin en 1958 señaló el desarrollo de una bacteriemia causada por Pseudomonas aeruginosa con el uso de una solución catiónica tensioactiva que había permanecido largo tiempo almacenada (163).

En Suecia en 1964 se produjeron ocho casos de infecciones oftálmicas que ocasionaron lesiones en córnea, por la aplicación de una pomada de hidrocortisona con anfomicina y neomicina y que estaba contaminada por Pseudomonas (149) (163).

También en este año, después de una operación intraocular, varios pacientes sufrieron graves infecciones producidas por la solución salina que se había utilizado y que contenía Pseudomonas aeruginosa (115).

Hugo y Foster en 1964 (107) comunicaron el desarrollo de Pseudomonas en soluciones de ésteres del ácido parahidroxibenzoico, que estaba a la concentración indicada por la Farmacopea Británica, y se utilizaba como conservador de colirios.

Ayliffe, 1965 (7) encontró Pseudomonas aeruginosa en una crema de manos y en solución salina de uso oftálmico que había producido infecciones en un hospital. También Nobel y Savin (149) indican los accidentes producidos por una crema de esteroides con 0,1% de clorocresol, que estaba contaminada por Pseudomonas aeruginosa.

En 1966 Mitchell y colaboradores detectaron siete casos de infecciones del tracto urinario después de una citoscopia, provocados por el lavado con solución antiséptica de clorheximida, y donde se había desarrollado Pseudomonas aeruginosa (142).

En 1976 Hecker estudió la significación clínica de especies de Pseudomonas encontradas en productos farmacéuticos (104) y también Baird y Shooter han estudiado las infecciones producidas por Pseudomonas (13).

La especie Staphylococcus aureus se puede encontrar formando parte de la población microbiana normal del huésped: piel, fosas nasales, boca e intestino en personas portadoras. Su poder patógeno se debe a diversos productos metabólicos y entre ellos la enterotoxina, cuya formación se ve favorecida por la presencia de algunos productos nutritivos como: lactosa, vitaminas, aminoácidos y azúcares. Estos microorganismos se pueden desarrollar en los folículos pilosos y provocar una infección masiva después de su proliferación (26).

Savin en 1967 (171) señaló que un número tan pequeño como de 15 estafilococos podían provocar síntomas de infección intestinal. La presencia de estafilococos en leches utilizadas en la lactancia artificial ocasionaron enteritis en los niños recién nacidos. Si este microorganismo se encuentra presente en el aire puede originar contaminación en los preparados farmacéuticos.

En 1962 Huisman y Daniels-Bosman, señalaron los incidentes producidos al administrar un preparado a base de pancreatina que contenía Salmonella (111).

En Suecia en 1966, se produjeron 237 casos de salmonelosis

por la administración de comprimidos de polvo de tiroides que estaban contaminados por Salmonella muenchen y Salmonella bareilly (115)(177). Como consecuencia de estos casos de salmonelosis, la Junta de Salud Sueca, recomendó unos métodos de control para determinar la contaminación microbiana en el proceso de fabricación y almacenamiento (145).

Leunington (131) encontró Salmonella en productos farmacéuticos y dietéticos.

En Estados Unidos y Gran Bretaña, se produjeron en centros hospitalarios casos de salmonelosis debidos a que el colorante (carmín) de unas cápsulas estaba contaminado por Salmonella (31)(128)(121).

Se observó la multiplicación de Ps. aeruginosa en una solución de benzilcloro-fenol, (21), producto de acción bactericida.

Hay determinados productos que se descomponen por la presencia de microorganismos, como Proteus y que provocan una irritación intestinal, que favorece la actuación de los microorganismos patógenos (177).

En la leche acidificada se aisló una cepa de Klebsiella pneumoniae que era especialmente patógena para la rata. También se encontró Klebsiella, resistente a antibióticos, y que fue causa de septicemias, en loción para niños (141).

Otros microorganismos que ocasionaron accidentes terapéuticos, han sido Enterobacter y Erwinia, que fueron la causa de septicemias en un hospital por la administración de soluciones parenterales (17).

Sevitt indicó la presencia de dos casos de infecciones producidos por los polvos de talco, que contenían esporas de Clostridium (176).

1.4. FUENTES PRIMARIAS DE CONTAMINACION

La contaminación microbiana de los preparados farmacéuticos depende de la calidad microbiológica de las materias primas, de las condiciones en que se desarrolla el proceso de fabricación y de la composición y forma farmacéutica del medicamento.

1. 4. 1. MATERIAS PRIMAS.

Las materias primas son las sustancias activas e inactivas que se emplean para la fabricación de medicamentos, tanto si permanecen inalteradas como si experimentan modificaciones.

La contaminación más frecuente de las materias primas en general, se debe a microorganismos resistentes a la desecación, como: bacilos esporulados aerobios, bacilos negativos, cocos gram positivos (micrococos, estafilococos y estreptococos del grupo D) y también a los mohos y levaduras (197).

En la tabla I-1 se resumen los resultados obtenidos de las investigaciones efectuadas sobre contaminación microbiológica en diversas materias primas, durante los años 1972 a 1976, por Bühlmann y col. (42).

Tabla I-1

Contenido microbiano de diversas materias primas.

Materias primas	Nº de muestras.	Nº de microorganismos aerobios.		Hongos		Presencia de microorganismos patógenos.
		10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	
Agar -Agar	14	7	7	11	3	0
Alginato	7	6	1	7	0	0
Gel de hidróxido de aluminio	50	40	10	48	2	0
Goma arábiga decolorada.	40	23	17	29	11	10
Goma arábiga bruta.	27	10	17	18	9	0
Goma arábiga desecada	26	16	10	25	1	3

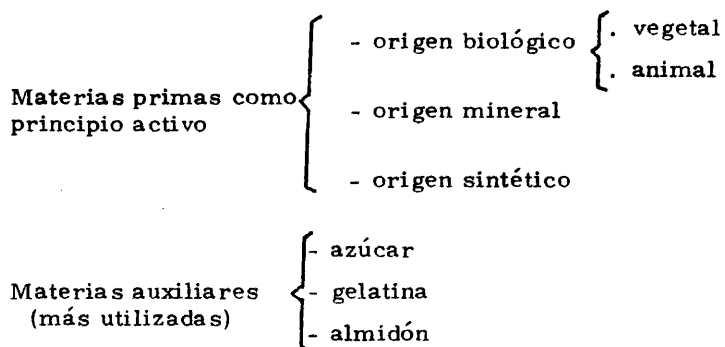
Tabla I-1

(cont.)

<u>Bolus alba</u>	26	22	4	25	1	0
Raíz de gal- gana	11	3	8	5	6	4
Gelatina	242	234	8	242	0	15
Cápsulas de gelatina dura	668	652	16	668	0	4
Cacao	167	96	71	158	9	21
Fécula de patata	28	27	1	25	3	4
Lactosa	330	326	4	328	2	22
Colorantes naturales (deshidratados)	125	108	17	121	4	0
Leche desna- tada en polvo	17	16	1	17	0	0
Fécula de maíz	125	111	14	114	11	10
Pancreatina	61	11	50	56	5	5
Pepsina	58	22	36	58	0	0
Materias pig- mentadas inclui- da laca.	239	198	41	222	17	0
Trisilicato de magnesio	2	2	0	2	0	0
Talco	167	149	18	154	13	3
Tragacanto	42	13	29	21	21	22
Raíz de viole- ta pulverizada	5	2	3	4	1	2
Fécula de trigo	46	40	6	43	3	5

Como se observa en la tabla, sino se tiene en cuenta la contaminación accidental, el grado de contaminación de las materias primas, depende de su origen y naturaleza (19). Por esta razón las

clasificamos según el siguiente esquema:



1.4.1.1. Materias primas como principio activo.

Los productos de origen biológico, animal o vegetal; presentan gran riesgo de contaminación y suelen tener una menor calidad desde el punto de vista microbiológico, debido a sus condiciones de recolección y almacenamiento. Su control ha de ser muy riguroso, ya que pueden ser vehículos óptimos para el transporte y proliferación de microorganismos (91). En las drogas de origen vegetal, en determinadas ocasiones, las operaciones de preparación y purificación, como ha señalado Schiller en 1968 (177) disminuyen de forma considerable la contaminación inicial. Sin embargo, no sucede lo mismo en las drogas de origen animal, en las cuales, la experiencia ha demostrado que el número de microorganismos totales revitalizables, puede ser de varios millones a miles por gramo. Las especies que aparecen más frecuentemente, son las de la flora intestinal, consideradas generalmente como microorganismos saprofitos pero su presencia puede indicar que en ocasiones puedan ir acompañados de microorganismos patógenos como Salmonella y Shigella (177). El encontrarse un elevado número de microorganismos, es debido a que los tratamientos de preparación y purificación son menos drásticos, y por tanto no disminuye el número de microorganismos de una manera considerable.

De vleeschouwer y colaboradores en 1979, en un estudio sobre las materias de origen vegetal y sus mezclas, señalaron que presentaban cifras muy importantes de contaminación, hasta de 10^7 microorganismos por gramo, con presencia de E. coli y Streptococcus del grupo D, como índice de contaminación fecal (65).

Algunos investigadores (135)(136)(186) han estudiado la población fúngica de materias primas de origen vegetal, en 1978 Hitokoto encontró que el número de hongos en este tipo de materias era variable y más de una de las muestras tenía una contaminación de 12.000 hongos por gramo; siendo éstos diversas especies del género Aspergillus, algunas de las cuales eran productoras de aflatoxinas.(108).

Las materias de origen mineral, por su naturaleza, no son un medio óptimo para el desarrollo de microorganismos, pero debido a su origen puede presentar, en ocasiones, una baja calidad microbiológica (82).

Las sustancias obtenidas por síntesis poseen cualidades nutritivas menos favorables que las de origen biológico; además su proceso de elaboración y purificación impide que presenten una contaminación masiva. Por todo ésto es fácil deducir que normalmente las materias de origen sintético contendrán un número de microorganismos inferior a 100 por gramo, y es frecuente que contengan menos de 10 microorganismos por gramo (82).

Sin embargo, algunas sustancias orgánicas son una excepción, como indicaron en 1968 Pederson y colaboradores (157) que encontraron que el lactato de calcio contenía más de 1000 microorganismos por gramo.

1.4.1.2. Materias auxiliares.

El azúcar es una de las materias primas más utilizadas en la industria farmacéutica, fundamentalmente en la fabricación de jarabes.

La Farmacopea Española (76) considera de utilidad farmacéutica el producto obtenido del jugo del tallo de la caña de azúcar y de la raíz de remolacha azucarera. También se puede emplear el procedente de banana y sorgo.

Aunque el número de microorganismos que se pueden encontrar en el azúcar es bajo, de varias decenas, sin embargo este número puede aumentar cuando su almacenamiento se realiza en un ambiente húmedo y con una temperatura óptima. En este caso, los microorganismos inicialmente presentes se pueden desarrollar, y su número puede llegar a ser de varios miles por gramo, produciéndose incluso, la licuación del azúcar. Los microorganismos que se pueden multiplicar en presencia de elevadas concentraciones de azúcar se denominan osmófilos. Principalmente son los hongos, siendo el más frecuente Penicillium glaucum (8), los responsables de este tipo de alteraciones que pueden producir la inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa. La fructosa es más higroscópica que la sacarosa y absorbe agua de la atmósfera. Para evitar estos inconvenientes, tanto el desarrollo de microorganismos, como la aparición de azúcares reductores, es preciso realizar el almacenamiento en locales que tengan una humedad ambiente controlada y donde no se produzcan cambios bruscos de temperatura por influencia del medio externo.

La gelatina se utiliza en la preparación de medicamentos, sobre todo para la fabricación de cápsulas de gelatina dura. Además puede ser empleada como sustancia auxiliar en la preparación de distintos medicamentos. La Farmacopea Española (76) la obtiene por decocción en agua de los huesos, ligamentos y pieles de varios animales y posteriormente hace una purificación del producto. La obtención puede realizarse por hidrólisis ácida o alcalina del colágeno.

Sus exigencias microbiológicas han sido cada vez mayores, debido a su gran utilización en la fabricación de medicamentos. Es sobre todo en la forma farmacéutica de cápsulas donde más se utiliza

por ser en estos últimos años unas de las formas de administración más difundidas.

Las féculas que se utilizan según la Farmacopea Española (76) en la industria farmacéutica, son las procedentes de Oryza sativa (arroz), Triticum vulgare (trigo) Solanum tuberosum (patata). Sin embargo, en la actualidad se utiliza también la fécula de maíz, que figura como oficial en las farmacopeas: Alemana (62), Británica (32), Francesa (160), Internacional (162) y USP (188)(189)(190).

Kallings y colaboradores en 1966, indicaron como fuentes de contaminación de los medicamentos, la fécula de patata, ya que 38 muestras de 39 analizadas, dieron un recuento de 20.000 microorganismos por gramo. En la fécula de trigo el recuento era de 5.000 microorganismos por gramo; y en ambas féculas fue detectada la presencia de coliformes. Sin embargo, la fécula de maíz, presentó mejor calidad microbiológica, ya que no se detectó la presencia de coliformes y el recuento de microorganismos fue menos de 10 por gramo (115). Otros investigadores han encontrado una mejor calidad microbiológica en las distintas féculas analizadas, como se observa en la tabla I-1 (pag. 12-13)

En 1971, Sykes (183) en un exámen microbiológico realizado en las féculas de uso farmacéutico, encontró recuentos del orden de 10^2 microorganismos por gramo y la mayoría de los contaminantes eran esporas de Bacillus subtilis, con escasa presencia de cocos y ocasionalmente de bacterias Gram-negativas.

Las féculas utilizadas en la industria farmacéutica, son de las materias que presentan una contaminación más elevada por hongos. Además reúnen las condiciones adecuadas para favorecer su desarrollo: como un cierto grado de humedad y ser también una fuente energética, para el desarrollo microbiano. En la fécula de arroz, los hongos encontrados en mayor proporción pertenecen a los géneros: Fusarium, Nigrospora, Trichoderma y Alternaria, y si hay una humedad relativa se puede favorecer el desarrollo de Aspergillus y Penicillium (58)

Guarro en un estudio realizado en las féculas de utilidad farmacéutica, encontró que los contaminantes más frecuentes pertenecían al género Penicillium y Aspergillus respectivamente. La especie Penicillium corylophilum, fue el contaminante más habitual en el almidón de trigo. La especie Aspergillus flavus, se encontró con mayor incidencia en el almidón de arroz, esta especie está considerada como potente elaborador de aflatoxinas (98) (99) (100).

Ylla-Catalá y Suárez (180) (200), han resaltado la importancia que presenta la presencia de especies de Aspergillus productoras de aflatoxinas, en las féculas de uso farmacéutico, en nuestro país.

Bühlman y colaboradores (41) hacen una clasificación general de las materias primas, en cuatro clases, basándose en su pureza microbiológica y en el criterio que se debe seguir para la realización de los controles:

- Clase 1: Sustancias que por su naturaleza se encuentran libres de microorganismos o tienen un número muy bajo. En este caso no es necesario el control.

- Clase 2: Sustancias con bajo contenido en microorganismos. El control se efectuará de forma ocasional.

- Clase 3: Sustancias con contenido variable en microorganismos. El control se realizará a la entrada de cada lote.

- Clase 4: Sustancias que debido a su origen siempre tienen el riesgo de contener un elevado número de microorganismos. Cada lote se someterá a control.

1.4.2. AGUA.

El agua en la industria farmacéutica no sólo es una materia prima de gran importancia en la preparación de formas líquidas, sino también una sustancia auxiliar en la elaboración de otros preparados farmacéuticos. Además se utiliza para la limpieza y en diversos usos técnicos como mantener la humedad relativa del aire (39). Diversos

autores han resaltado la importancia que tiene el agua como materia prima en los distintos procesos tecnológicos (30) (40) (183).

Habitualmente se emplea el agua del suministro público; para este agua que está destinada al consumo humano existe una legislación específica en cada país y en organismos internacionales como la O.M.S., que exigen una determinada pureza microbiológica.

En nuestro país esta normativa está recogida en el Código Alimentario Español (51), que establece dos categorías microbiológicas: la tolerable, que es menos exigente y la conveniente. Esta debe de tener los siguientes caracteres:

- Ausencia total de microorganismos patógenos y parásitos. Máximo de 50-65 colonias por ml. en el recuento de aerobios a 37°C durante 24 horas.
- Ausencia de coliformes en 100 ml.
- Ausencia total de E. coli en 100 ml.
- Ausencia de estreptococos del grupo D en 100 ml.
- Ausencia de esporas de Clostridium sulfito-reductores en 100 ml.
- Ausencia de bacteriófagos anti-E. coli.
- Ausencia de bacteriófagos anti-Shigella.

Esta calidad microbiológica se encuentra garantizada por los controles sistemáticos que realizan los laboratorios municipales y que afectan a toda la red de abastecimiento.

En determinados momentos la pureza química del agua, es más importante que su calidad microbiológica, y a veces los tratamientos que se realizan para la corrección de la calidad química van en perjuicio de la microbiológica.

La industria farmacéutica no utiliza el agua tal como la recibe del abastecimiento público, sino que la somete a tratamientos físicos y químicos (filtros de arena, carbón activo, resinas de intercambio iónico), para mejorar su calidad. Se ajustan parámetros como el pH y la resistividad. De estos tratamientos, el agua sale desprovista

del cloro que la protege y sus efectos antimicrobianos quedan anulados. Existe el peligro de que se desarrollen microorganismos, principalmente Pseudomonas y Flavobacterium, cuando este agua permanece almacenada. También puede haber crecimiento de otros microorganismos como coliformes y salmonelas.

El agua desde el punto de vista microbiológico tiene una gran importancia:

- Es uno de los mejores vehículos para transmitir los microorganismos, tanto los autóctonos como los alóctonos.
- En algunas ocasiones, es un medio de cultivo para las especies de Pseudomonas, que por tener pocas exigencias nutricionales se desarrollan en aguas que permanecen mucho tiempo almacenadas.
- Por su utilización en procesos tecnológicos, como es la pulverización en locales para mantener un cierto grado de humedad, se ha de tener especial cuidado que este agua no se encuentre contaminada, pues de lo contrario aportaría microorganismos al ambiente.

El sistema de distribución de la red de tuberías en la industria farmacéutica en ocasiones está construido con poco criterio microbiológico, pues existe un conglomerado de tuberías, conexiones transversales, juntas y recodos, porciones de ramales muertos, curvas en forma de U y S, que resulta difícil su limpieza. En estos sitios es muy fácil la acumulación de productos minerales y lodos que favorecen la proliferación de microorganismos, por ésto al final de cada tramo debe instalarse una llave para la toma de muestra. La llave de distribución, a ser posible, se instalara de tipo cónico, para facilitar su limpieza.

El material más adecuado para las conducciones de agua desionizada y destilada, es el tubo de vidrio, y en su defecto, el de plástico. En último lugar se utilizará las conducciones metálicas, sobre todo en el caso de agua desionizada, porque este material tiene una cesión iónica (196).

La limpieza de tuberías y recipientes de almacenamiento se

puede hacer por diferentes tratamientos:

- Paso de vapor de agua por la red de tuberías.
- Utilización de soluciones de hipoclorito. También pueden emplearse otro tipo de desinfectantes que pueden tener acción bacteriostática o bactericida, como por ejemplo fenol al 5%, que actúa sobre las formas esporuladas (59).

Los tipos de agua que se utilizan en la industria farmacéutica son:

Agua potable: Este agua puede contener un número de microorganismos que esté dentro de los límites aceptados por la legislación.

Agua desionizada: El agua desionizada es mucho más vulnerable, desde el punto de vista microbiológico, que el agua de la red de abastecimiento. Aunque se le ha privado de la mayor parte de sus iones, sin embargo pueden quedar los suficientes como para permitir una larga supervivencia de las bacterias que transporta e incluso, a veces, soportar su crecimiento.

El problema reside en las columnas de intercambio iónico que actúan como reservorio de microorganismos. Las resinas desionizadoras, además de iones minerales retienen materia orgánica y con ello, las bacterias encuentran un lugar ecológico propicio para su proliferación a gran velocidad, por presentar gran abundancia de nutrientes (102). El agua que va saliendo de estos tanques de intercambio iónico, cada vez tiene menor calidad microbiológica, pues se ha llegado a obtener recuentos de 1.000 y hasta 10.000 bacterias por mililitro (183). Este problema puede ser mucho mayor si las resinas de intercambio iónico se utilizan de una forma intermitente y no son regeneradas con adecuados tratamientos, ácidos o alcalis. En ocasiones este tratamiento de las columnas

no es suficiente, para eliminar las bacterias de las resinas, y es preciso algunas veces, un saneamiento con solución de formaldehído y posteriores lavados hasta su eliminación total. Por estas razones para la obtención del agua desionizada, se ha de disponer de un buen sistema desionizador, con regeneración periódica de las resinas.

El almacenamiento de este agua contaminada no disminuye el número de microorganismos. Filder en 1960, citado por Sykes (183), observó que obtenía recuentos de hasta 100000 bacterias por ml., después de unos cuantos días de almacenamiento.

Agua destilada: Inmediatamente después de la condensación es estéril, pero, con el tiempo y el almacenamiento, puede llegar a desarrollarse una abundante población de bacterias. Además este desarrollo se ve favorecido si el agua es conducida por tubos de goma o plástico hasta los recipientes de almacenamiento. Si estos tubos no son lavados y esterilizados con cierta frecuencia, actúan como reservorio de microorganismos y pueden contaminar el agua. Tal vez el mejor ejemplo de todo ésto, lo indicó Brown, citado por Sykes (183), que encontró en agua recién destilada recuentos del orden de 100000 bacterias por ml., todos eran bacilos negativos; pero cuando los tubos de plástico se reemplazaron cada día, el nivel de contaminación se redujo a menos de una bacteria por ml. Favero y colaboradores aislaron Pseudomonas aeruginosa en agua destilada que había sido almacenada (79).

En cualquier caso un agua destilada con recuentos superiores a 10 bacterias por ml., resulta inadmisibles desde el punto de vista microbiológico (102).

Los tanques de almacenamiento de agua que se instalen en la industria farmacéutica, se protegerán del polvo, partículas orgánicas y en general de la suciedad. Llevarán conductos de ventilación bien instalados. Se evitará la iluminación, para que no se favorezca el desarrollo de algas. Tendrán un sistema de toma de muestra adecuado, próximo al tanque o directamente conectado al mismo. Las paredes de su interior

serán de material impermeable no poroso y de fácil limpieza.

Bickel (27) señala que el agua utilizada en la industria farmacéutica, debe someterse a periódicos controles microbiológicos para poder garantizar su calidad.

1. 4. 3. PROCESO DE FABRICACION.

Debido a la gran variedad de formas farmacéuticas que se producen en la industria, la tecnología que se emplea es muy variada, según se trate de preparar comprimidos, grageas, granulados, líquidos, pomadas o supositorios.

Durante el proceso de elaboración influyen una serie de factores: temperatura adecuada y grado de humedad idóneo, que favorecen el desarrollo de los microorganismos si las materias utilizadas son una excelente fuente de energía: azúcar, almidón, gelatina y grasas.

En ocasiones, las distintas técnicas empleadas en el proceso de fabricación son una fuente potencial de contaminación. Sin embargo, Schiller (177) puso de manifiesto que en el proceso del grageado, el secado final disminuye el número de microorganismos. Por esto, se han de tomar las más estrictas medidas de higiene, encaminadas a evitar la contaminación durante el proceso de elaboración, para que los productos finales tengan la máxima calidad microbiológica. Estas medidas se aplicarán con mayor rigor en la preparación de inyectables (22) para poder lograr su esterilidad. También los productos de origen biológico deberán ser manipulados en las condiciones más estrictas de temperatura y humedad, en un medio ambiente lo más aséptico posible.

Es responsabilidad del Director Técnico y más directamente del Jefe de Control de Calidad, el adoptar todas las medidas oportunas, para lograr la máxima pureza microbiológica. Esto sólo se puede obtener con una estrecha vigilancia en la higiene del personal, ambiente, locales, maquinaria y útiles de fabricación, así como partir de unas materias primas con calidad microbiológica conocida.

En cada laboratorio farmacéutico, según sus características y tipo de medicamentos elaborados, se tendrán que adoptar unas normas, que serán debidamente observadas por el personal durante la fase de fabricación y en el almacenamiento de los preparados semielaborados y acabados.

Diversos organismos internacionales y nacionales como FDA (80), FIP (84), OMS (151) (152) (153) (154) (155) (156), Junta Nacional de Salud de Suecia (145) (182) y de Dinamarca (148) y distintas Farmacopeas: Americana (190), Italiana (78), Internacional (162) y Checoslovaca citada por Ludva (132), contienen normas prácticas encaminadas a conseguir una mejor calidad microbiológica.

Las normas de organismos, como OMS y FDA coinciden fundamentalmente en líneas generales. Las normas de la OMS se han adoptado, a modo de recomendación, en muchos países europeos. Alemania, además, elaboró un formulario en colaboración con los técnicos de la industria y los representantes de la Sanidad. En Francia, estas normas han sido estudiadas por una comisión de la industria, la administración e inspección farmacéutica. Sólo son tomadas en consideración para las industrias que solicitan exportación de medicamentos. Italia ha incorporado estas normas a la octava edición de su farmacopea, pero no tienen carácter de ley.

El organismo de la EFTA que agrupa a los países de: Dinamarca, Finlandia, Gran Bretaña, Irlanda, Islandia, Liechtenstein, Noruega, Austria, Suecia, Suiza y Hungría, tienen normas propias, que en líneas generales se ajustan a las de la OMS.

En la tabla I - 2 se resumen los países que tienen elaboradas normas de buena fabricación (GLP) y además el control de su aplicación.

Tabla I-2

Países con normas de buena fabricación.

País	Texto de normas de buena fabricación (GLP)	Control de la aplicación de las normas de buena fabricación (GLP)
Bélgica	No	No
Canadá	Previsto para 1982	Previsto-Inspección
Dinamarca	1/10/80	Si (21/3/73)-Inspección
Francia	No	Proyecto/Inspección
Gran Bretaña	No	Proyecto/Inspección
Japón	No	Si-Inspección
Noruega	No	Si-Inspección
Países Bajos	Si (proyecto)	No
R. F. Alemania	Si (proyecto)	No
Suecia	No	Si-Inspección
Suiza	No	Si-Inspección
Estados Unidos	Si F. D. A.	F. D. A. Inspección

Glomot, 1980 (95).

En España no existen normas al respecto, pero algunos autores (185), Asociaciones (187) y las primeras Jornadas Farmacéuticas (114), se han ocupado de comentar las normas de la OMS, resaltando la importancia de su aplicación, por lo cual muchos laboratorios de la industria las están teniendo en cuenta.

También diversos autores (57) (66) (81) (164), dan recomendaciones o normas de buena fabricación, que se pueden aplicar a estos procesos y que se resumen de la siguiente manera:

- Materias primas de calidad microbiológica controlada.
- Acondicionamiento adecuado de todos los locales, sin polvo, limpios y aislados de las corrientes de aire. Utilizar aire

- filtrado, siempre que lo requieran los productos fabricados y sea posible su instalación.
- Empleo de material adecuado de fácil limpieza.
 - Formación adecuada del personal que está en contacto directo con el medicamento durante el proceso de fabricación, para que sea conocedor y tome conciencia de los riesgos que supone la contaminación microbiana en los medicamentos y para evitar los posibles accidentes en el manejo de material especial.
 - Aplicación de una buena vigilancia para que se cumplan las normas higiénicas en el proceso de fabricación.
 - Controles sistemáticos de la contaminación a todos los niveles: materias primas, productos acabados, medio ambiente, superficies, maquinaria y personal.
 - Evaluación complementaria del envejecimiento del producto a la temperatura ambiente y a 37°C.
 - Adoptar las normas internacionales referentes a los límites tolerables de contaminación en los diversos preparados farmacéuticos.
 - Utilizar los conservadores de una forma justificada.
 - Envasar los preparados, a ser posible en dosis unitarias, para evitar la posterior contaminación en el curso de su utilización.

La aplicación de las normas de buena fabricación lleva consigo la obtención de productos finales con máxima calidad farmacéutica. Así Franch indicó que soluciones y geles, fabricados según las "normas de trabajo", podían considerarse exentos de microorganismos (87).

1.4.3.1. Condiciones higiénicas del personal.

Todo el personal que trabaja en la industria farmacéutica y muy especialmente el que está en contacto directo con la elaboración de

medicamentos, deberá ser conocedor de que el cuerpo humano es una fuente de contaminación de microorganismos. Por ello se les dará una completa educación sanitaria en materia de higiene personal, mediante cursillos, demostraciones prácticas y coloquios. En los cuales se resaltarán que el hombre sano a través de su piel aporta una carga microbiana, que forma parte de su micropoblación normal (23). Esta varía según las distintas regiones del organismo y también con los cambios ambientales de temperatura y humedad. En los individuos sanos y en ambiente normal; hay un predominio de micropoblación Gram-positiva, fundamentalmente Staphylococcus, Micrococcus y Corynebacterium. Cuando la humedad y la temperatura son más elevadas existe un predominio de micropoblación Gram-negativa, con mayor proporción de enterobacterias y Acinetobacter. En determinadas regiones hay una mayor presencia de hongos (138).

Los productores de la industria farmacéutica estarán sometidos a exámenes médicos, de forma periódica, para asegurar que no padecen procesos infecciosos o si los tienen poderlos detectar. Es aconsejable que diariamente se hagan observaciones del personal que trabaja directamente en el proceso de elaboración de medicamentos para detectar los signos visibles de infección en las vías respiratorias altas, heridas infectadas, lesiones cutáneas y enfermedades intestinales.

El personal debe observar un adecuado comportamiento en su aseo personal y costumbres higiénico-sanitarias, así como ser conocedor de las fuentes de contaminación durante la realización de su trabajo y también las medidas que ha de poner en práctica para evitar todo tipo de contaminación (106).

La utilización de ropas y zapatos adecuados, guantes, gorros y tapabocas es aconsejable en las zonas en que todavía no ha sido envasado el medicamento, y estas recomendaciones serán tenidas en cuenta de una manera más estricta, cuando las manipulaciones de las sustancias se realicen en ambiente estéril. En este caso, la misma ropa de

trabajo será también esterilizada y las personas que trabajen en estas zonas estériles tendrán que guardar una higiene personal antes de entrar. La higiene de las manos es muy importante, ya que las uñas pueden ser un reservorio idóneo para retener partículas y microorganismos y a la vez ser un vehículo de transmisión de estos contaminantes. Por ésto, a ser posible, el trabajador ha de realizar su trabajo con guantes.

1.4.3.2. Locales de trabajo y superficies.

Una de las fuentes más importantes que se deben considerar es la contaminación ambiental, para lo cual es preciso hacer la asepticación más estricta posible. Esto se puede conseguir con la instalación de un buen sistema de ventilación y filtrado del aire, que sean capaces de garantizar un ambiente adecuado.

El aire, a pesar de no tener una micropoblación propia, sin embargo contiene microorganismos, que permanecen suspendidos en partículas sólidas o en gotas de agua. El origen de estos microorganismos es el suelo, el agua y los seres vivos que permanecen en los distintos ambientes.

El tipo de microorganismos que se encuentra en el aire es muy variado. Fundamentalmente van a perdurar los microorganismos esporulados y los de menor tamaño, como : esporas de Bacillus, Clostridium, ascosporas de levaduras, fragmentos de micelios, conidios de mohos, estreptomicetos y, también, microorganismos no formadores de esporas como Micrococcus luteus, especies no patógenas de Corynebacterium y algunos bacilos Gram-negativos, como los coliformes (14).

El número de microorganismos es muy variable y depende de la persistencia y supervivencia de los mismos (43).

Los tipos de ambiente de trabajo pueden ser:

- zonas normales
- zonas estériles

- Las zonas de ambiente normal son todos los locales de producción de medicamentos no obligatoriamente estériles y donde no existen condiciones que garanticen la esterilidad.

- Las zonas estériles son locales cerrados e independientes, dedicados, única y exclusivamente, a la fabricación de medicamentos estériles. Deben disponer de lámparas germicidas, aire filtrado y una desinfección adecuada. El personal que trabaja allí, debe llevar tapabocas, guantes y batas.

En las zonas estériles se han de controlar de forma especial los parámetros de temperatura y humedad.

Estas zonas pueden presentar una deficiente esterilización del aire ambiental, si se mantiene un mal funcionamiento del sistema de filtración. También se pueden introducir contaminación por las materias y útiles que intervienen en la elaboración de medicamentos, y sobre todo por el personal encargado de los distintos procesos, sino observan unas normas higiénicas muy estrictas (18).

El sistema de filtración de aire dispondrá de filtros adecuados para evitar la recirculación de polvo durante la fabricación, para no facilitar las contaminaciones cruzadas o bien disponer de sistemas de aspiración auxiliar con presión positiva y cierre neumático. El filtro será capaz de retener partículas y microorganismos con tamaño superior a 0,5 micras.

Los controles del ambiente serán muy rigurosos en las zonas estériles, donde el contenido de microorganismos por metro cúbico será lo más bajo posible. Los controles microbiológicos del ambiente se deben realizar antes de la entrada del personal, durante el proceso de fabricación y al final de una jornada de trabajo, con el fin de controlar la eficacia de los filtros de aire y de todas las precauciones tomadas para conseguir un aire con mínima carga microbiana (41).

En la bibliografía (50) (91) (115), nos encontramos descritos casos que ponen de manifiesto la necesidad y utilidad del control micro-

biológico de los locales de trabajo. Ya que microorganismos presentes en el aire fueron la causa de la contaminación de diferentes formas farmacéuticas.

Además del aire ambiental hay que tener en cuenta la necesidad de que la maquinaria utilizada en los diferentes procesos de fabricación, sea lo más aséptica posible, para esto, deberá limpiarse después de cada lote de fabricación con agua caliente o vapor de agua.

Los suelos, paredes y techos, también son una fuente importante de contaminación por los microorganismos que se depositan en ellos. Por ello serán de superficie lisa, fácilmente lavables, impermeables al agua, sin orificios, ni grietas y resistentes a los agentes anti-sépticos (187). Periódicamente se tratarán con desinfectantes y se efectuarán controles de la eficacia de la desinfección. Esta deberá ir encaminada, no sólo a la destrucción o eliminación de microorganismos patógenos, sino también de los saprofitos que fundamentalmente son los que se aislan en la mayoría de las ocasiones en los medicamentos (193). Por lo tanto, los desinfectantes utilizados serán activos contra bacterias, hongos y virus y también sobre las formas esporuladas.

Para que la acción desinfectante se vea potenciada, hay que aplicar la desinfección en unas determinadas condiciones y teniendo en cuenta una serie de factores (59) (193) :

- La humedad relativa del aire.
- La concentración a que se debe emplear el desinfectante.
- El pH de acción esté próximo a la zona de máxima desinfección.
- Tiempo de contacto.
- Una temperatura controlada ya que las variaciones de temperatura pueden modificar el poder de desinfección.
- La clase de material que se va a desinfectar.
- El tipo de microorganismos presentes y las condiciones fisiológicas de éstos.
- Evitar la inactivación del desinfectante por procesos de

absorción.

- Evitar la aparición de resistencias al desinfectante, para esto lo más aconsejable es usar una mezcla de desinfectantes y variar el tipo de desinfectante con frecuencia.

1. 4. 3. 3. Forma Farmacéutica y formulación.

En los estudios microbiológicos realizados sobre distintas formas farmacéuticas, no se advierte una especial diferenciación desde el punto de vista de la contaminación microbiana.

Aunque Bean (20) indicó que los preparados que tienen una fase acuosa como: soluciones, suspensiones, jarabes, pomadas; son los que potencialmente presentan mayor riesgo de contaminación; por ser el agua uno de los componentes más importantes para la supervivencia y el desarrollo de los microorganismos.

Sin embargo las formas farmacéuticas que tienen un grado de humedad bajo como: comprimidos, grageas, granulados, cápsulas y polvos, no presentan gran diferencia en su contenido microbiano en comparación con el resto de las formas farmacéuticas. Además es precisamente en éstas, donde pueden permanecer los microorganismos esporulados.

También hay que tener en cuenta que en la formulación de las distintas formas farmacéuticas se suelen incorporar sustancias antimicrobianas, y que, en muchos casos, son los responsables del bajo contenido de microorganismos.

1. 4. 3. 4. Envases.

Todas las medidas tomadas durante el proceso de fabricación, para evitar la contaminación por microorganismos, pueden ser ineficaces si los medicamentos no se acondicionan en envases adecuados.

En nuestro país, la vida comercial media de un medicamento es de cinco años. Durante este período de tiempo, la naturaleza y

calidad del tipo de envase tiene gran importancia en la conservación y almacenamiento de los medicamentos.

La naturaleza de los materiales de envasado influye de forma considerable en la contaminación: Antes, se utilizaban mucho los tapones de corcho, lo que influía en que hubiera un mayor número de microorganismos, ya que este material es una fuente energética y nutritiva. Kylin y Ekstrands, citados por Clausen (50) pusieron de manifiesto la contaminación de inyectables que tenían tapón de corcho, con hongos, posiblemente del ambiente, y estafilococos, procedentes de los manipuladores.

Hoy día, prácticamente se ha eliminado este problema por haber sido sustituido este material por otros más adecuados. Uno de los materiales más utilizados para el envasado en la industria farmacéutica, son los plásticos. Estos materiales, desde el punto de vista microbiológico, tienen la ventaja de no favorecer el desarrollo de microorganismos, por no ser biodegradables. Por otro lado, presentan el inconveniente de tener un cierto grado de porosidad, que se manifiesta a niveles moleculares, frente a iones, gases y vapores. Presentan difusión del anhídrido carbónico y oxígeno; este influye, de una manera favorable, para que se produzca la proliferación de microorganismos en el producto envasado. Además presentan permeabilidad a los microorganismos cuando el manufacturado de los plásticos es de láminas obtenidas por soplado. Como estos envases facilitan la condensación de agua, pueden desarrollarse las formas esporuladas de mohos o bacilos, en los medicamentos que los contengan, y conducir a la alteración e, incluso, destrucción del medicamento. Estos inconvenientes se solucionan, en la industria farmacéutica, haciendo un recubrimiento de estos materiales plásticos --polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poliestireno, nylon y acetato de celulosa-- con papel de aluminio, que es más resistente a los efectos mecánicos y sobre todo, no es poroso (92).

Si la naturaleza de los materiales de envasado es de celulosa, para evitar los inconvenientes de la presencia de poros, se hacen recubrimientos con parafina.

Las materias primas se pueden contaminar si los materiales de embalaje no tienen una calidad microbiológica aceptable, siendo los hongos la contaminación más frecuente (47).

1.4.3.5. Almacenamiento.

Las materias primas y los productos acabados permanecen almacenados durante períodos de tiempo más o menos largos. En el almacenamiento es fácil el desarrollo de hongos en los preparados farmacéuticos, sobre todo en aquellos que tienen agua y grandes espacios libres de aire. En éste caso, la fuente de contaminación por hongos puede deberse a los envases y cierres contaminados. Su desarrollo se verá favorecido si el almacenamiento no se realizó en las debidas condiciones.

El almacenamiento de las féculas de utilización en la industria farmacéutica se realizará en unas condiciones de humedad inferiores al 12%, para evitar la proliferación de hongos y la posible producción de aflatoxinas por estos contaminantes (180). Debemos tener en cuenta factores, como son temperatura y humedad, que, de alguna manera, puedan influir en la estabilidad del medicamento durante este período, y de los que hablaremos en otro apartado.

1.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE LA CONTAMINACION.

1.5.1. AMBIENTE DE TRABAJO

El aire ambiental puede contribuir a la contaminación de los medicamentos por el permanente contacto con las materias primas y con los demás elementos implicados en la elaboración de los mismos(49).

Este ambiente tiene una micropoblación característica que se ha descrito anteriormente (1.4.3.2.).

La persistencia de estos microorganismos en el aire, va a depender de su forma, tamaño y peso. Así como de las corrientes de aire que se produzcan y de los obstáculos presentes. Sobre todo, los dos últimos contribuyen, en gran medida, a cambiar la flora microbiana que originariamente existía en el ambiente (43)(125).

La supervivencia de estos microorganismos depende de la humedad relativa y temperatura ambiental y de la materia orgánica presente, que los alimenta y protege de las condiciones adversas. Las radiaciones, tanto la luz solar como los rayos ultravioletas, por su acción mutágena o letal, son factores adversos que modificarán la contaminación microbiológica.

De aquí la gran importancia que tiene el control de todos estos factores, ya que para que el trabajo sea agradable debe haber una humedad relativa del 60% y una temperatura de 20°C y, en estas condiciones, se favorece el desarrollo de los microorganismos.

En las zonas estériles la posible contaminación microbiana puede deberse a:

- Deficiente esterilización del aire ambiental, por un mal funcionamiento del sistema de esterilización.
- Contaminación introducida por los materiales o útiles que intervienen en la fabricación de medicamentos.
- El personal encargado de los distintos procesos, si no sigue unas normas higiénicas muy estrictas (187).

1.5.2. PROCESO DE FABRICACION.

Hay procesos tecnológicos, que dependiendo de las condiciones y modificaciones que se les introduzca, pueden representar una mayor fuente de contaminación o por el contrario contribuir a la disminución de la carga microbiana inicial.

La molturación y la tamización son procesos, que pueden contribuir a un aumento de la presencia de oxígeno y este factor favorece la proliferación de microorganismos aerobios.

Uno de los ejemplos más claros de la influencia del proceso de fabricación, sobre el aumento o disminución de la contaminación, es la granulación por vía húmeda, para la elaboración de comprimidos que tienen como excipiente almidón. El desarrollo de microorganismos dependerá de que las operaciones se efectúen de forma más o menos rápida, se utilice agua o alcohol y que la temperatura de desecación sea próxima a 35-40°C. Sykes (183) indica que en las etapas del granulado húmedo es frecuente que tenga lugar crecimiento bacteriano, sin embargo estos microorganismos se convierten en no viables en posteriores etapas de secado y compresión. Se obtiene así un producto final que realmente no contiene mayor carga microbiana que la inicial.

Hay que señalar que otros autores (115)(200) indican que el proceso de granulación húmeda y su posterior secado, si se realiza a temperatura baja de 35-45°C, durante un período de tiempo grande, el aire en contacto y el tiempo empleado en la desecación son factores que contribuyen al desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, si el proceso de secado se realiza a 60°C, durante poco tiempo, muchos de los microorganismos presentes pierden su actividad y mueren.

1. 5. 3. ENVASADO Y ALMACENAMIENTO.

Hay varios factores que pueden modificar la calidad microbiológica durante el envasado y almacenamiento de los medicamentos. En el envasado los más importantes son la correcta limpieza y esterilización de los recipientes y cierres. Así como el tipo de envase, individual o múltiple, que influirá en la posterior conservación durante su uso. En el almacenamiento hay que tener en cuenta la temperatura, humedad y luz.

Las operaciones de envasado se deben realizar en áreas destinadas a este proceso, para evitar la posibilidad de mezclas con otras

sustancias y para reducir al máximo la contaminación microbiológica.

El material envasado se someterá a procesos adecuados de limpieza y de esterilización, por los diferentes métodos, según su naturaleza. Es aconsejable y conveniente que los envases sean herméticamente cerrados, para que la humedad del ambiente no pueda penetrar y favorecer el desarrollo de mohos, tanto en jarabes como en comprimidos y granulados. Para prevenir la posible contaminación con hongos es adecuado emplear cartonajes con fungicidas. También es importante utilizar envases individuales o monodosis, ya que representan una gran higiene en la administración del preparado, evitando así la incorporación de microorganismos por el propio paciente que lo utiliza.

Hay medicamentos que se pueden someter a un proceso antimicrobiano mediante un tratamiento térmico. Pero en el caso de los jarabes, gotas y pomadas que no pueden ser sometidos a temperaturas altas, el mantener una buena calidad microbiológica presenta una gran dificultad. Esto se agrava por el hecho de que estos preparados suelen presentarse en recipientes multidosis, por lo que pueden presentar alteraciones durante el período de utilización por el paciente.

Los medicamentos que no pueden ser sometidos a un tratamiento térmico deben protegerse mediante métodos químicos.

El almacenamiento de los productos farmacéuticos ha de reunir las condiciones más adecuadas para su perfecta conservación. La temperatura ambiente ha de ser constante. Los locales destinados a almacén, tanto de materias primas como de productos acabados, estarán acondicionados con aislamiento térmico, para evitar los cambios de temperatura exteriores. Se evitará la instalación de calefacción, el paso de tuberías de agua caliente y de todos aquellos factores que puedan inducir a variaciones en la temperatura. Ya que estas variaciones pueden modificar los caracteres físico-químicos de los preparados farmacéuticos y favorecer el desarrollo de los microorganismos. En el caso de los jarabes, una elevación de la temperatura hace que aumente la humedad

relativa en el espacio de cabeza, una posterior refrigeración hará que el vapor de agua se condense y se forme en la superficie del jarabe una capa fina de agua. El azúcar difundirá lentamente desde la masa a esta capa de agua, puesto que tiende a establecerse un equilibrio. Es por tanto la alteración de la temperatura, durante el almacenamiento lo que hace que se produzca una disminución de la concentración de sacarosa en la capa superficial lo cual contribuye al desarrollo de mohos en la superficie.

Hay productos que por sus características especiales deben de ser almacenados en cámaras frigoríficas para su conservación.

La humedad relativa de los locales de almacenamiento ha de ser debidamente controlada para evitar las posibles alteraciones de los medicamentos, ya que una humedad relativa superior a 97% puede favorecer el desarrollo de microorganismos, sobre todo de hongos, en la superficie de granulados y comprimidos.

La luz es otro factor que en ocasiones puede catalizar reacciones que induzcan a la alteración de los preparados farmacéuticos.

1.5.4. CONSERVADORES.

Los profesionales del medicamento, después de varios años, conocen la necesidad de proteger a los medicamentos contra la contaminación microbiana. Pero han sido en estos últimos diez años, cuando se ha empezado a saber los serios problemas de la conservación y a tenerlos en consideración. Ante todo, es muy importante poner en práctica las normas de buena fabricación para disminuir al máximo la utilización de conservadores.

Los conservadores sólo se deben utilizar de forma justificada, para prevenir la contaminación de los medicamentos antes y durante su período de administración; pero nunca para enmascarar una masiva contaminación microbiana (113).

La disponibilidad química de un conservador en un preparado farmacéutico puede variar durante el almacenamiento por:

producirse absorción del conservador por el material conservado, por las contaminaciones que se pueden incorporar durante su utilización por el paciente y también por modificaciones a la temperatura ambiente.

La actividad conservadora de una sustancia puede ser influenciada por el producto. Si este producto es complejo, es mayor el número de factores que influyen sobre la actividad.

Desvignes (61) estudió la influencia de los excipientes sobre la actividad de los conservadores en preparaciones emulsionadas.

Los criterios que se deben seguir para elegir el conservador de un preparado farmacéutico son:

- Inocuidad.
- No tener olor, color o sabor.
- No presentar incompatibilidad con los componentes del medicamento y que no reaccione con éstos.
- Solubilidad.
- Estabilidad durante el almacenamiento.
- Que no interfiera en los controles analíticos del medicamento.
- Amplio espectro de acción.
- Que no favorezca la aparición de resistencias.

Los factores que influyen en la actividad de un conservador, sobre todo en las emulsiones, son:

- Variación en el pH.
- Formación de complejos con sustancias que han sido emulsionadas o bien con los agentes dispersantes.
- El coeficiente de reparto del conservador entre los distintos componentes de una emulsión.

Las modificaciones de pH producen cambios en la ionización de los grupos químicos de superficie de las bacterias y pueden dar lugar a una ionización de los conservadores, y también influir sobre el coeficiente de reparto del conservador, entre el producto que se

pretende conservar y el microorganismo que se encuentra como contaminante.

Estos tres factores pueden intervenir juntos. Así un aumento de pH en la solución de un producto cuaternario, conduce a un aumento de la actividad antimicrobiana. La elevación de pH en una solución fenólica o de ácidos orgánicos, reduce la absorción celular y también la actividad de estas sustancias (24).

Es preferible utilizar bajas concentraciones de un conservador con acción bactericida lenta, en lugar de emplear los de acción bacteriostática.

Durante el proceso de fabricación es aconsejable cambiar el conservador cada ciertos periodos de tiempo, para evitar la aparición de resistencias selectivas, sobre todo a especies de Pseudomonas y enterobacterias. Es adecuado el uso de dos o más conservadores que presenten acción sinérgica.

La utilización de un conservador específico en algunos preparados farmacéuticos, encaminados a eliminar la contaminación bacteriana, puede producir un vacío ecológico que facilite el desarrollo de hongos. Este fenómeno se ha observado en jarabes y lociones, que habían sufrido una alteración de su aspecto, calidad y eficacia (107) (116). Los jarabes se protegen de la contaminación porque llevan alcohol, glicerina a alta concentración o una mezcla de ésteres del ácido parahidroxibenzoico. También el ácido sórbico se utiliza como conservador al 0,15-0,20 % de concentración (32). Los jarabes de frutos pueden protegerse de la contaminación de hongos por adición de ácido sulfuroso o metabisulfito sódico que corresponde a 350 p. p. m. de SO_2 (8).

En las preparaciones alcalinas es frecuente la contaminación, sobre todo en las suspensiones de trisilicato de magnesio, donde se produce una rápida proliferación de microorganismos, posiblemente debido al pH alcalino que tienen estas preparaciones, que unido a otros factores, hacen que la actividad de los conservadores se dismi-

nuya. Por esto es de gran importancia la utilización de un conservador apropiado.

Los niveles de contaminación más bajos, se encontraron en preparados farmacéuticos con: bajo pH, alto contenido en sacarosa y bajo pH, bajo pH y ácido benzoico, contenido moderado de cloroformo o alto contenido de alcohol. Más altos niveles de contaminación se encontraron en preparados con pH próximo a la neutralidad y bajo contenido de alcohol o sacarosa (24).

Tabla I-3

Agentes conservadores recomendados por las farmacopeas.

Agente conservador	B. P.	Farmacopea francesa	U. S. P.	P. H.
Fenol	0, 5%	0, 5%	0, 5%	-
Cresol	0, 3%	0, 3%	0, 5%	0, 3%
Clorocresol	0, 1%	0, 3%	-	0, 2%
Compuestos orgánicos de mercurio	0, 001%	-	0, 1%	-
Metilparaben.	-	-	-	0, 1%

B. P. (32), Farmacopea francesa (160), P. H. (161), U. S. P. (189).

Tabla I-4

Actividades de los agentes conservadores, recomendados por B. P.

Agente conservador	%(P/V)	tiempo letal 10 ³ /ml. <u>E. coli</u>
Clorocresol	0, 1	10 minutos
Cresol	0, 3	30 minutos
Nitrato de mercurio féénico	0, 001	2 horas
Fenol	0, 5	10 horas

B. P. (32)

La USP estima, que la actividad de los conservadores

para que sea efectiva, ha de tener una mortalidad del 100% aunque ésta es una condición que es difícil de demostrar en la práctica.

1.5.5. CONDICIONES AMBIENTALES RELACIONADAS CON EL MICROORGANISMO.

1.5.5.1. Temperatura.

Es uno de los factores más importantes que influyen en el desarrollo de los microorganismos. Generalmente las temperaturas bajas disminuyen el metabolismo microbiano, mientras que las temperaturas altas aumentan las actividades celulares. Por esto, si se realiza un almacenamiento de los preparados farmacéuticos fuera de los límites de crecimiento, se reduce de manera considerable el desarrollo de microorganismos.

Siñ embargo, hay que tener en cuenta que cada especie microbiana tiene ciertos límites de temperatura, máximo y mínimo, superados los cuales cesa el crecimiento microbiano.

Las temperaturas límites de desarrollo de los microorganismos varían desde temperaturas bajas de -15°C hasta tan altas como 90°C . Y según esto se denominan:

- Psicrófilos: Crecen a 0°C o menos. Aunque éste sea su carácter más distintivo, pueden crecer a temperaturas más elevadas. Su crecimiento óptimo tiene lugar entre $10-30^{\circ}\text{C}$.

- Mesófilos: tienen su temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 45°C .

- Termófilos: su óptimo de crecimiento está entre $45-50^{\circ}\text{C}$;

Las especies que crecen también en la zona de temperatura de las mesófilas, se les denomina termófilas facultativas.

Tabla I-5

Clasificación de las bacterias según su temperatura de crecimiento

Bacterias	Temperatura (°C)		
	Mínima	Optima	Máxima
Psicrófilos	- 15-5	10-30	20-40
Obligado	- 15-0	10-20	20-22
Facultativo	- 5-5	20-30	30-40
Psicrotrófos	- 5-5	25-30	30-40
Mesófilo	5-25	25-40	40-50
Termófilo	35-45	45-65	60-90
Obligado	40-45	55-65	70-90
Facultativo	35-40	45-55	60-80

Banwart, 1979 (14)

1.5.5.2. pH.

Sorenson en 1909, definió el pH como el logaritmo negativo de la concentración de hidrógeno, en una solución. Actualmente el pH es el logaritmo negativo de la actividad de los iones hidrógeno. Por un aumento de la temperatura aumenta la disociación de los ácidos. Así una solución que es neutra o ligeramente alcalina a la temperatura ambiente y favorece el desarrollo de los microorganismos, puede convertirse en ácida a la temperatura de 37°C y ser letal para ellos.

Los microorganismos tienen un pH de crecimiento mínimo, óptimo y máximo. El pH óptimo de desarrollo de la mayoría de los microorganismos es próximo a la neutralidad, entre 6,5 y 7,5; aunque existen especies que pueden sobrevivir en zonas mínimas de pH 4 y máximas de pH 9. Sólo muy pocas especies pueden crecer en valores de pH menores de 2 o mayores de 10.

En general, los mohos pueden crecer a valores más bajos de pH que las levaduras, y las levaduras son más tolerantes a estos pH que las bacterias. La mayor parte de las levaduras y hongos se ha visto que crecen mejor en medios ligeramente ácidos, de pH 5 a 6. (14).

1.5.5.3. Presión osmótica.

La presión osmótica está provocada por la presencia de moléculas, disociadas o no, en los disolventes. La ósmosis tiende a igualar las concentraciones a ambos lados de una membrana.

Cuando los microorganismos se encuentran sometidos a presiones osmóticas extremadamente altas o bajas, el agua es substraída de la célula y ésta se colapsa (plasmólisis) o penetrará en el interior (plasmotisis).

Los microorganismos pueden vivir entre unos límites máximo y mínimo de presión osmótica del medio, teniendo cada especie un punto óptimo, aunque son bastante adaptables.

Las bacterias debido a que tienen pequeño volumen, a su pared celular relativamente fuerte y a la fina membrana citoplasmática, permiten que se produzca un rápido ajuste del equilibrio osmótico. En general la mayoría de las bacterias no son muy sensibles a variaciones en la concentración salina entre 0,5 y 3%, pero concentraciones superiores pueden tener un carácter inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos.

Las soluciones muy hipertónicas, como los jarabes (64% de azúcar) tienen un poder conservador, ejerciendo un efecto microbiostático sobre muchos microorganismos, porque extraen el agua de las células. Esta acción es comparable a la desecación. Algunas bacterias y hongos son capaces de soportar una fuerte presión osmótica.

La glicerina a baja concentración puede ser utilizada como alimento por los microorganismos, pero éste mismo producto en una concentración 40-50% es ya inhibidor del crecimiento bacteriano, por la acción de la presión osmótica.

1.5.5.4. Actividad de agua (aw)

La actividad de agua (aw) en las sustancias se puede considerar como un índice de disponibilidad de agua para las reacciones químicas.

cas y para el crecimiento de los microorganismos.

La actividad de agua se ha definido como la relación, a la misma temperatura, entre la presión de vapor de agua de la solución y la presión de vapor del solvente (generalmente agua).

La actividad de agua tiende a establecer un equilibrio con la humedad relativa del entorno.

Los microorganismos tienen un máximo, un óptimo y un mínimo de actividad de agua para su crecimiento. Al ser la actividad del agua pura 1, los microorganismos no pueden crecer en ella, y el límite máximo de crecimiento microbiano ha de ser algo menor que uno.

Hay productos, como los alimentos, que tienen unos valores muy altos de actividad de agua, de hasta 0,999, es decir muy próximos a 1 y a pesar de esto, los microorganismos pueden desarrollarse en ellos.

En general, para el desarrollo de las bacterias se requiere una elevada actividad de agua, mientras que las levaduras pueden desarrollarse a una menor actividad.

Los mohos difieren entre sí considerablemente en el óptimo de a_w . La a_w mínima necesaria para la germinación de las esporas es, en algunos mohos, de 0,62; mientras que para otros es 0,93.

Se ha de tener en cuenta que la actividad de agua influye en aspectos tan importantes, como la formación de esporas y la elaboración de toxinas por parte de los microorganismos patógenos, como: Staphylococcus aureus o Clostridium botulinum.

Cuando la actividad de agua es inferior al mínimo requerido por los microorganismos, es de suponer que estos no se desarrollan y así, al tener una actividad de agua que ha descendido a valores más bajos que su óptimo, se produce un aumento de la fase de latencia y una disminución de la tasa de crecimiento. Por esto las sustancias con actividad de agua baja van a poder ser almacenadas más tiempo y van a tener menores alteraciones por los microorganismos, que los

materiales que tienen una actividad de agua más elevada.

La actividad de agua tiene influencia sobre la resistencia de los microorganismos a los agentes físicos, como el calor. En general cuando disminuye la actividad de agua, la resistencia de los microorganismos aumenta (14).

1. 6. MICROBIOLOGIA DE LOS PREPARADOS FARMACEUTICOS DE VIA ORAL.

En general los controles microbiológicos realizados por diferentes investigadores demuestran, que los medicamentos de via oral tienen una calidad microbiológica aceptable (141) ; pues frecuentemente la contaminación encontrada no es superior a 100 microorganismos por gramo o mililitro de producto, si bien en ocasiones estos controles han revelado una abundante contaminación por microorganismos saprofitos e incluso por patógenos.

- Comprimidos.

En la bibliografía encontramos que los primeros trabajos de control microbiológico, fueron realizados en 1951 por Mauron (137), Lambin y colaboradores (126), que realizaron un estudio sobre comprimidos de distinta naturaleza y demostraron que los contaminantes más frecuentes eran debidos a especies del género Bacillus.

Posteriormente, aumentó la preocupación por la contaminación de los preparados de via oral, debido a los accidentes terapéuticos producidos. Ernefeldt en 1963 (71) encontró E. coli en comprimidos e incluso llegó a demostrar que esta contaminación era debida al almidón de patata que se había empleado en su elaboración.

Ludva en 1964 (132) encontró una abundante contaminación en estos preparados, destacando la importancia de la presencia de los hongos que contenían.

En 1966 Kalling y colaboradores (115) pusieron de manifiesto

que aproximadamente el 50% de las muestras analizadas de comprimidos presentaban coliformes. Otros microorganismos identificados fueron Alcalígenes, B. subtilis, S. epidermidis y levaduras. Sólo en dos casos se encontraron enterococos y S. aureus, respectivamente. También estos mismos investigadores encontraron en comprimidos de tiroides S. muenchen y S. bareilly además de presentar una fuerte contaminación, fundamentalmente debida a coliformes (más de 10^5 microorganismos/gramo).

En 1968 Fischer y colaboradores (85) encontraron en comprimidos una abundante contaminación por bacilos Gram-positivos, presencia de coliformes y en una de las muestras se aisló E. coli. Se puso de manifiesto la presencia de un número significativo de Clostridium en comprimidos que contenían un laxante vegetal.

Sykes en 1971 (183) realizó un control microbiológico de distintos tipos de comprimidos y puso de manifiesto que la contaminación encontrada en la mayoría de las muestras era de menos de diez bacterias por comprimido y los microorganismos que se presentaban con mayor frecuencia eran bacilos Gram-positivos esporulados, aunque también se encontró E. coli y Salmonella.

Gallien (89) en un estudio realizado sobre distintas materias y productos acabados, de administración oral, encontró que una de las muestras de comprimidos tenía 2500 hongos por gramo.

Desvignes y colaboradores (60) encontraron que aproximadamente el 50% de los comprimidos analizados presentaban contaminación en mayor o menor grado y en dos muestras distintas se encontró esta-filococos patógenos y Clostridium sulfito reductores.

Ylla-Catalá (200) demostró experimentalmente la aparición de hongos en la superficie de comprimidos envasados en tiras de aluminio, cuando aumenta el grado de humedad de esta forma farmacéutica.

. - Grageas.

Ernefeldt (71) encontró E. coli en estos preparados y pudo determinar que esta contaminación, era debida al almidón de patata utilizado en su elaboración.

Gallien (89) en un estudio microbiológico realizado en grageas, encontró recuentos de bacterias muy bajos, del orden de 65 bacterias por gramo y no se encontró presencia de hongos.

Sin embargo Desvignes y colaboradores en 1973 (60) encontraron que eran precisamente las grageas las formas farmacéuticas más contaminadas de todos los preparados analizados, y además en dos muestras había presencia de Clostridium sulfito reductores.

. - Pildoras.

Devleeschouwer y Dony (64) en un estudio realizado en 1979, sobre fórmulas magistrales secas, encontraron que más del 50% de las píldoras presentaban contaminación elevada, y además el 93% eran bacterias aerobias, consideradas como especies telúricas del género Bacillus. También había en algunas muestras presencia de estafilococos, enterobacterias, estreptococos y bacilos Gram-negativos oxidativos de los azúcares.

Respecto a la contaminación por hongos, encontraron recuentos de 10^4 hongos por gramo en algunas muestras.

. - Granulados.

Gallien en 1972 (89) observó que de todos los preparados de vía oral, la forma farmacéutica que mayor contaminación presentaba eran los granulados, en los cuales se encontraron recuentos de hasta 1,500 bacterias por gramo, sin embargo no había presencia de mohos y levaduras.

En 1973 Desvignes y colaboradores (60) encontraron contaminación en todos los preparados analizados, en mayor o menor grado, y en dos casos se puso de manifiesto la presencia de estreptococos

fecales.

. - Polvos.

En 1977 Mosso y colaboradores (144) en un trabajo sobre preparados alcalinos, polvos, encontraron que la calidad microbiológica, era aceptable, aunque en una de las muestras el número de hongos era de 720 por gramo. Los contaminantes más frecuentemente encontrados en todas las muestras fueron especies del género Bacillus.

. - Cápsulas de gelatina.

Gallien (89) encontró que estos preparados farmacéuticos tenían una contaminación muy pequeña, 45 bacterias por gramo y no tenían presencia de hongos.

También Desvignes y colaboradores en 1973 (60) encontraron que la mayoría de las preparaciones analizadas presentaban escasa contaminación y sólo un 20% tenía más de 1.000 bacterias por gramo, no encontrándose presencia de microorganismos patógenos.

Devleeschouwer y Dony en 1979 (64) encontraron que la contaminación más abundante en este tipo de preparados era debido a Bacillus y en menor proporción a estafilococos potencialmente patógenos. Respecto a la contaminación por hongos se encontraron recuentos menores de 100 hongos por gramo.

. - Preparados líquidos.

En 1966 Kallings y colaboradores (115) en un estudio microbiológico de decocciones e infusiones determinaron una elevada contaminación por bacterias y levaduras siendo las especies más frecuentes: B. subtilis, S. epidermidis, S. aureus, S. faecalis, E. aerogenes, E. coli, Ps. aeruginosa y Candida guilliermondii.

En 1967 el Servicio Nacional de Salud de Dinamarca(148) en un estudio microbiológico realizado en preparados líquidos elaborados en oficina de farmacia y en la industria, encontraron que la contaminación por hongos en los

preparados industriales era menos elevada que en los elaborados en la oficina de farmacia. Esto se puede deber en gran parte a la utilización de técnicas de percolación o infusión.

Brennan y colaboradores (30) encontraron que tres muestras, elaboradas en farmacia hospitalaria, tenían presencia de microorganismos patógenos y además estos microorganismos estaban presentes en el ambiente hospitalario.

En 1969, Hirsch (107) en un análisis microbiológico de jarabes, elixires y suspensiones, determinó que presentaban contaminación un 80% y aproximadamente 35% de las contaminaciones eran debidas a microorganismos considerados como patógenos: enterococos, estafilococos, Pseudomonas; siendo el contaminante más frecuente el género Bacillus y entre los hongos, los géneros Aspergillus y Penicillium.

En 1971, Robinson (167) en preparados líquidos alcalinos encontró Pseudomonas aeruginosa y también coliformes. Beveridge (25) en preparados que habían elaborado según fórmula de la Farmacopea Británica, encontró que la mixtura de ipecacuana, mixtura de citrato potásico y otras mixturas, tenían presencia de coliformes y también presentaban alto contenido de hongos y levaduras. Los hongos eran, sobre todo, especies de Penicillium y algún Cladosporium. En un preparados de ipecacuana se encontró E. coli.

En el estudio microbiológico realizado por un grupo de investigadores en 1971 (166) sobre preparados líquidos, de utilización hospitalaria, encontraron que los preparados con agua de menta, mixtura de trisilicato de magnesio y loción de sulfato de zinc; tenían presencia de estafilococos coagulasa negativo en gran proporción y en menor número se encontró Pseudomonas aeruginosa, Salmonella y Shigella. Además en un preparado se encontró E. coli y en otras dos S. aureus.

En preparados alcalinos se encontró Pseudomonas aeruginosa. Se observó que el recuento total de microorganismos en el 12% de estos preparados contenía más de 10.000 bacterias por mililitro.

Azria en 1971 (8), en un estudio sobre jarabes comercializados en Francia, encontró que 18 jarabes tenían presencia de Pseudomonas aeruginosa y sólo uno contenía estafilococos patógenos.

En 1972 Lambín y colaboradores (127) encontraron que aproximadamente 95% de los jarabes analizados presentaban contaminación en mayor o menor grado y una tercera parte tenían presencia de hongos.

Desvignes y colaboradores (60) en un análisis microbiológico de gotas y ampollas bebibles, pusieron de manifiesto que eran los preparados que menor contaminación presentaban, de todos los medicamentos de vía oral analizados.

1.7. METODOLOGIA.

En la bibliografía consultada se ha puesto de manifiesto, como indica Bühlmann (41), que los controles microbiológicos no se deben realizar sólo en casos especiales; sino que es conveniente y necesario realizarlos de forma regular y establecer la frecuencia más conveniente en cada caso. La USPXX (190) indica que la frecuencia de los controles microbiológicos debe de estar de acuerdo con el tipo de producto, con ésto se podrá garantizar una mejor calidad microbiológica de éstos. Diversos autores (8) (60) (126) (127) (140) (141) y organismos internacionales (82) (83) (84) se han preocupado de establecer y comentar cuales son los métodos más adecuados según sus criterios.

Los métodos utilizados en el control microbiológico de productos farmacéuticos no estériles, han de ser métodos sencillos y conocidos, que permitan obtener resultados fiables y reproducibles. Es necesario tener en cuenta una serie de parámetros que influyen directamente en la

realización práctica de los métodos de control, como son:

- Forma de realizar el muestreo.
- Periodo de preincubación de las muestras.
- Preparación de la muestra.
- Medios de cultivo utilizados.
- Temperatura y tiempo de incubación.
- Interpretación de los resultados.

. - Forma de realizar el muestreo.

En el caso de los controles físicos y químicos, la obtención de resultados fiables, no presenta problemas desde el punto de vista de la homogeneidad del lote. Sin embargo no sucede lo mismo cuando se trata de realizar un muestreo para un control microbiológico, pues el concepto de homogeneidad del lote, desde el punto de vista de la contaminación microbiológica es muy variable (175).

La toma de muestra se ha de realizar de forma aséptica y por personal especializado. En cuanto a la cantidad y número de muestras necesarias para el control microbiológico existen diferentes criterios según las farmacopeas (190), organismos como F.I.P. (84) y diversos autores (41)(44)(69).

Así la Farmacopea Europea (72) propone que se fije una cantidad para cada producto. Lo normal es analizar 10 gramos o mililitros, tomando 1 gramo o mililitro de 10 unidades individuales de un mismo lote, (190) sin tener en cuenta el tamaño de la muestra.

Para realizar el control microbiológico, según la USP (190), se necesitan 30 gramos o mililitros y según la F.I.P. (84) 20 gramos o mililitros. La utilización de estas cantidades puede representar un problema económico, cuando se trata del control de productos de elevado coste.

. - Periodo de preincubación de la muestra.

Hay autores como Dony y Gerard (66) que resaltan su

importancia, sobre todo para la investigación de microorganismos anaerobios productores de toxinas y de gas. La preincubación, aconsejan que se realice a 30-32°C durante 15 días, pero también hay que indicar que Azria (8) no encontró valores muy significativos en los recuentos, cuando realizó la preincubación de los jarabes a 37°C y a la temperatura ambiente.

También el periodo de preincubación va encaminado a:

- Poner de manifiesto los microorganismos resistentes a los conservadores.
- Comprobar la eficacia del conservador.
- Asegurar la estabilidad del preparado.
- Acelerar el desarrollo de los microorganismos presentes (66).

. - Preparación de la muestra.

Para conseguir una adecuada preparación de la muestra hay que tener en cuenta algunas características del producto, como son: su solubilidad, la naturaleza de sus componentes, la presencia de sustancias antimicrobianas y el grado de contaminación.

La muestra tomada en condiciones estériles se suspenderá o disolverá en un diluyente adecuado, que normalmente es una solución tampón, a la cual se puede adicionar una pequeña proporción de Tween 80.

La característica más importante que debe reunir el diluyente es: favorecer la dispersión de los microorganismos presentes. Para esto es aconsejable añadir sustancias tensioactivas, como Tween 80 al 0,1%, que no interfieren en los resultados finales y además ejercen una acción protectora sobre las formas vegetativas (38).

Otro factor importante en la preparación de la muestra es el pH final, que debe ser próximo a la neutralidad, en caso de no serlo, se ajustará (84).

. - Medios de cultivo.

En general los medios de cultivo utilizados para recuento de

microorganismos, tienen unas características y composición muy parecidas y responden a las exigencias nutricionales de muchos microorganismos. Así uno de los medios de cultivo más utilizados, es el medio triptona-soja, que ha sido recomendado, también para la realización del test de esterilidad en la USP, por reunir características nutricionales adecuadas.

Cuando se trata de investigar microorganismos patógenos se emplean medios de enriquecimiento adecuados a cada grupo o también medios selectivos, para aumentar la sensibilidad en la detección de estas especies. Los medios de enriquecimiento sirven para detectar un número muy bajo de microorganismos, tanto en preparados sólidos como líquidos.

. - Temperatura y tiempo de incubación.

Para la elección de una adecuada temperatura de incubación, se tendrá en cuenta cual es la zona óptima para el desarrollo del mayor número de microorganismos de cada tipo que puedan estar presentes. Así han considerado (84)(190) que la temperatura de incubación para las bacterias mesófilas es de 30 a 35°C y 37°C para las patógenas, durante 2 a 5 días y a 25°C para los mohos y levaduras durante 5 días.

. - Interpretación de los resultados.

Siempre será realizada por personal especializado, y se basará fundamentalmente en el tipo de microorganismos aislados e identificados y también se tendrá en cuenta el recuento total, cuando presente cifras muy elevadas.

1.8. NORMATIVA Y RECOMENDACIONES.

Las Farmacopeas de la mayoría de los países contienen una reglamentación para los preparados que tradicionalmente se han considerado estériles, pero en lo referente al resto de los preparados sólo existen normas definidas para algunos productos y medicamentos. En cambio varias Farmacopeas, algunos organismos

internacionales y diversos autores, han hecho una clasificación de los medicamentos en 3 ó 4 categorías, desde el punto de vista microbiológico. Estas normativas o recomendaciones, son muy semejantes en cuanto a las exigencias microbiológicas, aunque existen pequeñas diferencias en cuanto a la cifra límite de microorganismos.

Las primeras exigencias microbiológicas, para los preparados orales, estaban encaminadas a exigir la ausencia de microorganismos patógenos y a limitar el número de microorganismos saprofitos, sin dar demasiada importancia a la presencia de mohos y levaduras, que son en muchas ocasiones las que causan la alteración de los preparados líquidos (107).

La primera Farmacopea que da normas, para los preparados no estériles, es la segunda edición de la Farmacopea Checoslovaca. Requiere que los comprimidos y otros medicamentos estén libres de microorganismos patógenos y su contenido en saprofitos, no sea mayor de 50.000 bacterias por gramo o mililitro, citado por Ludva (132).

La tercera edición, citada por Azria (8), hace dos grupos:

- Primera categoría: Los preparados farmacéuticos que no deben contener más de 1.000 microorganismos no patógenos por gramo o mililitro y más de 100 mohos y levaduras.

- Segunda categoría: El resto de los preparados que no deben contener más de 10.000 microorganismos no patógenos por gramo o mililitro y más de 100 mohos y levaduras.

La Farmacopea Internacional (75) contiene especificaciones para la inspección de la calidad de los preparados farmacéuticos y recomienda que las cifras límites de contaminación de los medicamentos no estériles, sean por lo menos las mismas que las exigidas para los alimentos, según la legislación de cada país.

La Farmacopea Británica (32) señala que se han de cumplir las normas de buena fabricación para: jarabes, elixires, lociones, soluciones no estériles y cremas; resaltando el peligro de contaminación

que presentan estas preparaciones durante su elaboración, envasado y almacenamiento, sino se toman las medidas higiénicas adecuadas. Describe métodos, con carácter de recomendación, para el examen de E. coli, Salmonella y Pseudomonas. En algunos productos exige:

- Ausencia de Pseudomonas en 1 mililitro de gel de hidróxido de aluminio y de gel de fosfato de aluminio.

- Ausencia de E. coli en 1 gramo y de Salmonella en 10 gramos de gelatina, pancreatina y cochinilla.

La última edición de la Farmacopea Británica de 1980 (33), describe métodos, con caracteres de recomendación, para la investigación de E. coli, Salmonella y Pseudomonas. En cuanto a las materias primas exige:

- Ausencia de Salmonella en 10 gramos de cochinilla.

- Ausencia de Pseudomonas en 1 gramo de hidróxido de aluminio seco, de fosfato aluminio seco, en 1 mililitro de gel de hidróxido de aluminio y de gel de fosfato de aluminio.

- Ausencia de E. coli en 1 gramo de goma de tragacanto,

- Ausencia de E. coli en 1 gramo y de Salmonella en 10 gramos de gelatina.

En cuanto a los preparados farmacéuticos, sólo indica que los preparados de digital deben tener ausencia de E. coli en 1 gramo y ausencia de Salmonella en 10 gramos.

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en sus distintas ediciones va introduciendo nuevas exigencias. La USP XVIII (188), recomienda la aplicación de normas de buena fabricación, desde el punto de vista microbiológico y establece las siguientes normas para algunas materias primas:

- Ausencia de Salmonella en goma arábica y agar.

- Ausencia de Salmonella y E. coli en carbón activo y almidón.

- La gelatina ha de tener menos de 5.000 bacterias por gramo.

- El polvo de levadura ha de tener menos de 7.500 bacterias por

gramo y menos de 50 mohos.

En cuanto a los preparados farmacéuticos, sólo indica que las suspensiones orales de aluminio y magnesio han de tener menos de 100 microorganismos aerobios por mililitro y ausencia de E. coli.

La USP XIX (189) aumentó sus exigencias, sobre la calidad microbiológica, indicando que materias primas como:

- La gelatina ha de contener menos de 1.000 bacterias por gramo y ausencia de E. coli y Salmonella.
- Ausencia de Salmonella en polvo de tiroides, acacia y agar.
- Ausencia de E. coli y Salmonella para almidón.

En cuanto a preparados farmacéuticos señala que los comprimidos de tiroides han de tener ausencia de Salmonella.

El Formulario Nacional de E. U. de 1975 (146) sugiere que algunos productos y preparados vegetales y animales estén libres de Salmonella como son: pancreatina, pancreolipasa, Rauwolfia serpentina, y tripsina cristalizada; comprimidos de ácido dehidrocólico, tiroglobulina y tripsina cristalizada y comprimidos y cápsulas de digital, pancreatina y pancreolipasa. Para las soluciones y suspensiones orales, ausencia de E. coli; para las preparaciones de uso tópico, ausencia de Pseudomonas aeruginosa y S. aureus y en los preparados de aplicación rectal, uretral o vaginal, se realizará un recuento total de microorganismos.

La USP XX (190) sugiere que algunos productos, deben ser sometidos rutinariamente a un control microbiológico, como son: plantas naturales, productos de origen animal y algunos de origen mineral; en los que se investigará la presencia de Salmonella.

Esta edición de la Farmacopea de los Estados Unidos, da algunas normas para preparados farmacéuticos no estériles. Así en los preparados de uso tópico deben investigarse Ps. aeruginosa y S. aureus, y para los preparados de aplicación rectal, uretral y vaginal se debe

realizar un recuento total de microorganismos.

En cuanto a materias primas exige:

- Ausencia de E. coli y un recuento inferior a 1.000 bacterias aerobias por gramo en silicato de aluminio y magnesio.
- Ausencia de Salmonella en polvo de Rauwolfia serpentina y pancreatina.
- Ausencia de Salmonella y E. coli en: tiroglobulina y tiroides.

En los preparados farmacéuticos exige:

- Ausencia de Salmonella en comprimidos de ácido dehidrocólico, comprimidos y cápsulas de digital, y comprimidos de Rauwolfia serpentina.
- Ausencia de Salmonella y E. coli en comprimidos de tiroglobulina.

Siendo más exigente para la suspensión oral de hidróxido de aluminio y magnesio, que ha de tener menos de 100 microorganismos por mililitro y ausencia de E. coli. La suspensión oral de aluminio y magnesio, ha de tener ausencia total de microorganismos aerobios en 100 mililitros y en especial de E. coli. En general en las suspensiones y soluciones se debe investigar la presencia de E. coli.

El Formulario Nacional de EEUU de 1980 (147) indica la importancia de partir de unas materias primas de calidad microbiológica conocida y aplicar una estricta higiene en el proceso de fabricación, para así disminuir el número de microorganismos. Además señala que productos como: la Acacia y agar, han de tener ausencia de Salmonella; el cacao ausencia de E. coli en 10 gramos y el recuento total de microorganismos ha de ser menor de 5.000 por gramo. Azúcar, azúcar en confitura, tragacanto, almidón, ácido algínico, han de tener ausencia de Salmonella y E. coli; caramelo ha de tener ausencia de Salmonella, E. coli, S. aureus, Ps. aeruginosa.

La Farmacopea italiana en su octava edición (78) sólo da normas de buena fabricación para el control de la calidad de los medicamentos.

Las Farmacopeas que no dan ninguna normativa para los medicamentos no estériles, son: la novena edición de la Farmacopea española (76), la novena edición de la Farmacopea francesa (160), la cuarta edición de la Farmacopea portuguesa de 1961 (77), la sexta edición de la Farmacopea helvética (161).

Las exigencias propuestas para la Farmacopea Europea (72) y la D.A.B. (62) están resumidas en el cuadro I-1.

Cuadro I-1. Exigencias microbiológicas de los medicamentos.

Farmacopea Europea (propuesta) 1975 (72)

D. A. B. (propuesta) 1971 (62)

Categoría	Producto	Exigencias	Producto	Exigencias
1	Inyectables y preparados oftálmicos	Estéril.	Inyectables y preparados oftálmicos.	Estéril.
2	Preparados de uso local, piel lesionada, nasal, vaginal, oído y preparados orales acuosos	-Límite de microorganismos: 10^2 bacterias revitalizables por g. o ml., y mohos y levaduras. -Ausencia de patógenos: <u>E. coli</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Ps. aeruginosa</u> , <u>S. aureus</u> .	Preparados de uso local, piel lesionada, nasal, vaginal y oído.	-Límite de microorganismos: 10^2 bacterias revitalizables por g. o ml. -Ausencia de patógenos: <u>E. coli</u> , <u>S. aureus</u> , <u>Ps. aeruginosa</u> , <u>Salmonella</u> .
3	Preparados orales no acuosos	-Límite de microorganismos: 10^4 bacterias revitalizables por g. o ml., y paramecios y levaduras: 10^2 g. o ml. -Ausencia de patógenos: <u>E. coli</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Ps. aeruginosa</u> , <u>S. aureus</u> .	Preparaciones orales	-Límite de microorganismos: 10^4 bacterias. -Ausencia de patógenos: <u>E. coli</u> , <u>S. aureus</u> , <u>Ps. aeruginosa</u> , <u>Salmonella</u> .

Después de muchos años de estudio, numerosos autores han propuesto distintas normas.

Millet y colaboradores en 1965 (141) señalan los límites de contaminación, para los medicamentos no estériles:

- El número de aerobios y anaerobios saprofitos revitalizables debe ser menor de 10.000 por gramo del producto.
- El número de microorganismos no patógenos de procedencia fecal debe ser inferior a 10 por gramo de producto.
- No debe haber presencia de patógenos.

Las normas recomendadas en Suecia en 1968 (145) y que tienen carácter oficial, señalan que los preparados de vía oral no deben tener más de 100 microorganismos por gramo o mililitro. No es necesario investigar la presencia de microorganismos patógenos si se utilizan materias primas de calidad microbiológica conocida y se elaboran estos preparados según normas de buena fabricación. Si se sobrepasa esta cifra, se investigan los microorganismos patógenos y los que se consideran índices de un proceso de fabricación poco higiénica como: Salmonella, coliformes, Ps. aeruginosa, S. aureus, B. cereus, Cl. botulinum y Cl. perfringens.

En 1968 Dony y Gerard (66) señalan que los preparados de administración oral han de tener menos de 10.000 bacterias saprofitas aerobias y anaerobias por gramo, ausencia de patógenos y cumplir los requisitos para las conservas de alimentos propuestos por Buttiaux y Mossel (45) (143). Estos requisitos son:

- Ausencia en 1 gramo de producto de microorganismos patógenos y en especial Salmonella y Shigella.
- Ausencia de bacterias toxigénicas (Cl. botulinum y Cl. perfringens) en 5 gramos de producto y de S. aureus en 0,1 gramo de producto.
- Ausencia en 1 gramo de producto de microorganismos indicadores de contaminación fecal (E. coli, Cl. perfringens y S. faecalis).

Penso (158) se muestra más exigente en cuanto a los criterios sobre el límite de contaminación, proponiendo 50 bacterias

por gramo o mililitro , para jarabes y elixires; 100 para las preparaciones secas y 10.000 para las cápsulas de gelatina, como máximo.

En 1969, Hess y colaboradores (105) indican que los medicamentos de via oral deben tener una calidad microbiológica semejante a la exigida para los alimentos, según la legislación de los distintos países.

Azria (8) en 1971 propone que la calidad microbiológica de los jarabes por mililitro de preparado ha de ser:

- Ausencia de microorganismos revitalizables potencialmente patógenos.
- Límite de microorganismos revitalizables será, menos de 100.
- Ausencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal (E. coli, S. faecalis, Cl. perfringens) y de Staphylococcus patógenos.

Evans (73) sugiere que los medicamentos no estériles, deberían estar libres de endotoxinas, al igual que para los preparados de via parenteral se les exige, estén libres de pirogenos

Bruch en 1972 (35)(36) en unos comentarios sobre la normativa USP XVIII, sugiere que además de que los medicamentos estén exentos de microorganismos patógenos, también deberían estar libres de microorganismos, que denomina "indeseables". Este término no sólo engloba a los microorganismos patógenos y a los potencialmente patógenos para el usuario, sino también los que pueden causar alguna alteración en el medicamento, en particular los que producen una destrucción del principio activo y por esta razón pueden interferir de alguna forma en la función terapéutica del producto.

Bruch ha sugerido distintas listas de microorganismos "indeseables" para diferentes grupos de medicamentos, en función de su via de administración. Así para medicamentos de administración oral, considera:

A. - Siempre "indeseables".

Salmonella y E. coli.

B. - Frecuentemente "indeseables".

Enterobacter, Pseudomonas sp., S. aureus enterotoxigénicos, Clostridium proteolíticos, hongos productores de micotoxinas y C. albicans.

Gay (94) y Rafols (164) indican que los preparados orales han de tener como cifras límite de contaminación:

- Microorganismos revitalizables:
 - . menos de 10.000 bacterias por gramo o mililitro.
 - . menos de 100 mohos y levaduras por gramo o mililitro.
- Ausencia en 1 gramo de enterobacterias y otras bacterias toxigénicas.

Bühlmann, y colaboradores en 1972 (41) señalan que los criterios sobre el límite de la contaminación para este tipo de preparados ha de ser:

- Microorganismos revitalizables:
 - . menos de 1.000 bacterias por gramo o mililitro.
 - . menos de 100 mohos y levaduras por gramo o mililitro.
 - . ausencia en 0,1 gramo o mililitro de Ps. aeruginosa, S. aureus, bajo número de enterobacterias en 1 gramo y ausencia de Salmonella, Shigella y E. coli.

Además de estos investigadores, también organismos como la Federación Internacional Farmacéutica (F.I.P.) en 1972 (82) y 1975 (84) se han preocupado de elaborar una normativa para los preparados de administración oral, que se resume en el cuadro I-2

Cuadro I-2. Exigencias microbiológicas de los medicamentos. F. I. P. 1972 (82), 1975 (84).

Categoría	Productos	Exigencias	
1a	Inyectables	Esterilidad. Condiciones fijadas en las Farmacopeas	
1b	Preparados oftálmicos, preparados de aplicación en las cavidades del cuerpo normalmente libres de microorganismos, piel quemada y ulcerada	Ausencia de microorganismos revitalizables en 1 g. o ml.	
2	Preparaciones de aplicación local: sobre piel lesionada, nariz, garganta, oído, etc. (preparaciones de alto riesgo).	<p>1972</p> <ul style="list-style-type: none"> -Límite de microorganismos revitalizables: 10^2 bacterias por g. o ml. -Ausencia de: <u>Enterobacterias</u>, <u>Ps. aeruginosa</u>, <u>S. aureus</u>. -Límite de mohos y levaduras revitalizables: 10^2 por g. o ml. 	<p>1975</p> <ul style="list-style-type: none"> -Límite de microorganismos revitalizables: 10^3 a 10^4 bacterias por g. o ml.; 10^2 mohos y levaduras por g. o ml. -Límite para microorganismos específicos: ausencia de <u>E. coli</u> por g. o ml. -En algunos casos: ausencia de <u>Salmonella</u> en 1 g. o ml.; otras enterobacterias, como máximo 10^2 por g. o ml.; ausencia de <u>Ps. aeruginosa</u> en 1 g. o ml.; ausencia de <u>S. aureus</u> en 1 g. o ml.
3	Otras preparaciones	<p>1972</p> <ul style="list-style-type: none"> -Límite de microorganismos revitalizables: 10^3 bacterias por g. o ml. -Ausencia de: <u>Enterobacterias</u>, <u>Ps. aeruginosa</u>, <u>S. aureus</u>. -Límite de mohos y levaduras revitalizables: 10^2 por g. o ml. <p>1975</p> <ul style="list-style-type: none"> -Límite de microorganismos revitalizables: 10^3 a 10^4 bacterias por g. o ml.; 10^2 mohos y levaduras por g. o ml. -Límite para microorganismos específicos: ausencia de <u>E. coli</u> por g. o ml. -En algunos casos: ausencia de <u>Salmonella</u> en 1 g. o ml.; otras enterobacterias, como máximo 10^2 por g. o ml.; ausencia de <u>Ps. aeruginosa</u> en 1 g. o ml.; ausencia de <u>S. aureus</u> en 1 g. o ml. 	

1.9. OBJETO DEL TRABAJO

La investigación de la contaminación microbiológica de los preparados farmacéuticos no obligatoriamente estériles, es un tema de primordial interés para la industria farmacéutica de todo el mundo, por razones de tipo sanitario y económico ya expuestas anteriormente como: yatrogenia desencadenada en las personas por los medicamentos contaminados y alteraciones físico-químicas producidas por la presencia de los microorganismos y que conducen al deterioro del preparado.

En algunos países europeos, principalmente Francia y Alemania, y en Estados Unidos, hace años ya se vienen realizando estudios microbiológicos de distintos tipos de medicamentos no estériles, como se refleja en la bibliografía. Sin embargo en España no existen hasta el momento estudios de esta clase, y por tanto no se conocen cifras comparativas del nivel de calidad microbiológica de las diversas especialidades que de este tipo de preparados existen en nuestro país.

Dentro de este grupo de medicamentos, nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de los preparados de administración oral por dos razones:

1.- La mayor parte de los medicamentos se administran por esta vía, la más natural, y por tanto hay un gran número de personas que los emplean.

2.- Hay una gran variedad de formas farmacéuticas en estos preparados. Su elaboración requiere distintos procesos tecnológicos que pueden influir en su calidad microbiológica.

Nosotros hemos creído de gran interés la realización de este trabajo para aportar un mayor conocimiento de la calidad microbiológica de los preparados comercializados en nuestro país, tal como son administrados al paciente y hacer un estudio comparativo de todos ellos, según las formas farmacéuticas. Con el fin de proponer unas normas microbiológicas propias, ya que existen escasos datos bibliográficos

y no hay nada legislado al respecto.

Para el desarrollo del presente trabajo hemos planteado los siguientes puntos:

1. - Nivel de calidad microbiológica.
2. - Microorganismos contaminantes más frecuentes.

El estudio microbiológico ha consistido en:

- Determinar el número de bacterias aerobias viables mesófilas y anaerobias, esporuladas y no esporuladas, mohos y levaduras. Los recuentos se han realizado por los métodos de: placa, NMP y filtración.
- Investigación de la presencia de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación fecal: Salmonella, Shigella, Ps. aeruginosa, S. aureus, coliformes, E. coli y S. faecalis.
- Aislamiento e identificación de los microorganismos encontrados.

66

II MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES.

2.1.1. MATERIAL EXPERIMENTAL.

Especialidades farmacéuticas de administración oral:

- Comprimidos.
- Grageas.
- Cápsulas.
- Polvos.
- Granulados.
- Jarabes.
- Soluciones.
- Extracto fluído.

2.1.2. APARATOS.

- Cámara de flujo laminar vertical, marca "Telstar".
- Microscopio compuesto binocular, marca "Leitz".
- Triturador y homogenizador, marca "Stomaker".
- Estufas de cultivo: 25°C, 30°C, 37°C; marca "Alvarez".
- Autoclave, marca "Selecta".
- Baños termostáticos de agua a 50°C, 80°C, 100°C, marca "Heron".
- Medidor de pH, marca "Bechman".
- Balanza automática, marca "Bosh".
- Lupa binocular, marca "Wild".
- Jarra de anaerobios, marca "Torbal".
- Agitador mecánico, marca "Super-Mixer".
- Equipo de filtración, marca "Millipore".
- Bomba de vacío, marca "Afora".
- Aparato medidor aw, marca "Lufft".

2. 2. MEDIOS DE CULTIVO

2. 2. 1. MEDIOS PARA RECUESTO

- . Bacterias aerobias

Caldo triptona-soja

Composición:

Triptona (digerido pancreático de caseína)	17 g.
Glucosa	3 g.
Cloruro sódico	5 g.
Fosfato disódico	2, 5 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7, 3 a 25°C; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Envasar en tubos con 9 ml.

Agar triptona-soja

Composición:

Triptona (digerido pancreático de caseína)	15 g.
Peptona de soja	5 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7, 3 a 25°C; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- . Bacterias anaerobias

Agar infusión cerebro corazón

Composición:

Infusión de 200 g. de cerebro de ternera.
Infusión de 250 g. de corazón de buey.

Proteosa-peptona	10 g.
Glucosa	2 g.
Cloruro sódico	5 g.
Fosfato disódico	2,5 g.
Extracto de levadura	5 g.
Clorhidrato de cisteína	0,3 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,4; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- Mohos y Levaduras

Agar OGA

Composición:

Extracto de levadura	5 g.
Glucosa	20 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 6,6; se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Enfriar a 45-50°C y añadir 0,1 g. de oxitetraciclina a 1000 ml. de medio. Tender placas.

2.2.2. MEDIOS DE AISLAMIENTO

- Bacterias aerobias

Agar triptona-soja

Descrito en (2.2.1.)

- Bacterias anaerobias

Agar infusión cerebro corazón.

Descrito en (2. 2. 1.)

VL para cultivo en profundidad.

Composición:

Triptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Extracto de carne	2 g.
Extracto de levadura	5 g.
Clorhidrato de cisteína	0,3 g.
Agar	6 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,4-7,5; se esterilizó en autoclave a 115°C durante 20 minutos. Se envasó en tubos 180x9 mm a razón de 5 a 7 ml.

-. Mohos y Levaduras

Agar Sabouraud.

Composición:

Neopeptona	10 g.
Glucosa	40 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 5,6; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Czapek-Dox

Composición:

Sacarosa	30 g.
Nitrato sódico	1 g.
Fosfato disódico	1 g.
Cloruro potásico	0,5 g.

Sulfato ferroso	0,01 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,3; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2.3. MEDIOS PARA LA INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS PATOGENOS

- Escherichia coli.

Caldo lactosa.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Peptona	5 g.
Lactosa-D	5 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es de 7,2; se esterilizó en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

Agar Mac Conkey.

Composición:

Peptona	20 g.
Lactosa	10 g.
Sales biliares	5 g.
Cloruro sódico	5 g.
Rojo neutro	5 g.
Agar	12 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,4; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Preparar placas.

- Salmonella y Shigella.

Caldo lactosa

Descrito en (2.2.3.)

Caldo Selenito

Composición:

Triptona	5 g.
Lactosa	4 g.
Selenito sódico	4 g.
Fosfato sódico	10 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7; calentar hasta ebullición, repartir en tubos; no se esterilizó en autoclave.

Caldo tetracionato.

Composición:

Proteosa-peptona	5 g.
Sales biliares	1 g.
Tiosulfato sódico	30 g.
Carbonato sódico	10 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se disuelve, calentando a 60°C en un baño de agua, y a cada 100 ml. de medio se añaden 2 ml. de solución de yodo, que se prepara disolviendo 6 g. de cristales de yodo y 5 g. de yoduro potásico en 20 ml. de agua. El pH final es de $8,4 \pm 0,2$; repartir en tubos; no se esterilizó en autoclave.

Agar Mac Conkey

Descrito en (2.2.3.)

Agar verde brillante-rojo de fenol.

Composición:

Proteosa-peptona	10 g.
Extracto de levadura	3 g.
Lactosa	10 g.
Sacarosa	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agar	20 g.
Verde brillante	0,00125 g.
Rojo fenol	0,08 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 6,9; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Salmonella-Shigella (SS)

Composición:

Extracto de carne	5 g.
Proteosa-peptona	5 g.
Lactosa	10 g.
Sales biliares	8,5 g.
Tiosulfato sódico	8,5 g.
Citrato férrico	1 g.
Agar	13,5 g.
Verde brillante	0,32 g.
Rojo neutro	0,025 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7; no se esterilizó en autoclave, los componentes del medio se disuelven por ebullición y después se tienden placas.

- Pseudomonas aeruginosa.

Caldo triptona-soja

Descrito en (2.2.1.)

Agar King A.

Composición:

Peptona	20 g.
Cloruro magnésico	1,4 g.
Sulfato potásico	10 g.
Glicerol	10 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es $7 \pm 0,2$; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Tender placas.

Agar King B.

Composición:

Triptona	10 g.
Proteosa-peptona	10 g.
Fosfato dipotásico	1,5 g.
Sulfato de magnesio	1,5 g.
Agar	15 g.
Glicerol	10 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es $7 \pm 0,2$; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se tienden placas.

-. Staphylococcus aureus.

Caldo triptona-soja con cloruro sódico.

Composición:

Caldo triptona-soja	1.000 ml.
Cloruro sódico	75 g.

El pH final es $7,3$ a 25°C ; se esterilizó en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

Agar Baird-Parker.

Composición:

Triptona	10 g.
Extracto de carne	5 g.
Extracto de levadura	1 g.
Glicerina	12 g.
Cloruro de litio	5 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	950 ml.

El pH final es 7, 2; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Añadir al medio, enfriado a 45°C-50°C, estérilmente 50 ml. de solución de yema de huevo y 3 ml. de solución de telurito potásico al 3, 5%. Tender placas.

-: Streptococcus faecalis

Caldo glucosa-azida.

Composición:

Extracto de carne	4, 5 g.
Peptona	10 g.
Glucosa	7, 5 g.
Cloruro sódico	7, 5 g.
Azida de sodio	0, 2 g.
Agua destilada	1,000 ml.

El pH final es 6, 8; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio de Lisky (Caldo EVA).

Composición:

Triptona	20 g.
Glucosa	5 g.
Fosfato disódico	2, 7 g.

- 76 -

Cloruro sódico	5 g.
Azida de sodio	0,4 g.
Violeta de etilo	0,00083 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2.4. MEDIOS PARA LA IDENTIFICACION DE BACILLUS

Agar almidón.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Peptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Almidón	10 g.
Agar	18 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7±0,2; se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Se tienden placas.

Agar gelatina de Frazier.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Peptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Gelatina	40 g.
Agar	18 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7; se esterilizó en autoclave a 115°C durante 20 minutos. Se tienden placas.

Agar caseína.

Composición:

Leche estéril	1 parte.
Solución estéril de agar agua al 3% a pH-7	1 parte.

La leche y la solución de agar agua se mezclan estérilmente y se tienden placas.

Agar lecitina.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Cloruro sódico	5 g.
Peptona	10 g.
Agar	18 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7; se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos, se deja enfriar a 45°C-50°C y se añade estérilmente 10 ml. de solución estéril de yema de huevo a cada 95 ml. de medio, y se tienden placas.

Agar inclinado de extracto de suelo.

Composición:

Peptona	5 g.
Extracto de carne	3 g.
Agar	20 g.
Extracto de suelo	1,000 ml.

El pH final es 7, se esterilizó en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

El extracto de suelo se preparó con 1000 g. de tierra de jardín y 2400 ml. de agua ; se mezcló y se esterilizó a 121°C durante 60 minutos, después se filtró.

Caldo de peptona.

Composición:

Peptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7,2; se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Medio de Smith

Composición:

Peptona	7 g.
Cloruro sódico	5 g.
Glucosa	5 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7,5; se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Caldo nitrado.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Peptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Nitrato potásico	1 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7 - 7,2; se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Agar movilidad.

Composición:

Peptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agar	5 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7,2; se esterilizó en autoclave a 120°C du-

rante 20 minutos. Los tubos se dejan solidificar en posición vertical.

Medio VL para cultivo en profundidad.

Descrito en (2. 2. 2.)

Medio base de fermentación de azúcares.

Composición:

Fosfato amónico	1 g.
Cloruro potásico	0, 2 g.
Sulfato de magnesio	0, 2 g.
Solución de púrpura de bromocresol al 0, 04%	12 ml.
Agar	13 g.
Agua destilada	1,000 ml.

El pH final es 7; se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Los azúcares utilizados son: glucosa, arabinosa, xilosa, sacarosa, manitol, lactosa; se añadieron al medio estéril y enfriado a 45°C-50°C, al 0, 5%; se envasó en tubos y se dejó solidificar en plano inclinado con mucho fondo.

Agar fenil-alanina (APP).

Composición:

Extracto de levadura	3 g.
Fosfato dipotásico	1 g.
Cloruro sódico	5 g.
DL-fenil alanina	2 g.
Agar	12 g.
Agua destilada	1,000 ml.

El pH final es 7, 3; se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Agar citrato de Simons.

Composición:

Sulfato de magnesio	0,2 g.
Fosfato amónico hidrogenado	0,2 g.
Fosfato sódico amónico	0,8 g.
Citrato sódico tribásico	2 g.
Azul de bromotimol	0,08 g.
Agar	15
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7; se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Se deja solidificar en posición inclinada.

Agar Urea de Christensen.

Composición:

Peptona	1 g.
Glucosa	1 g.
Cloruro sódico	5 g.
Fosfato monopotásico	0,8 g.
Rojo fenol	0,012 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 6,9; se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos; se deja enfriar a 45°C-50°C y se añaden 5 ml. de solución de urea al 40%, esterilizada por filtración a cada 95 ml. de medio. Se deja solidificar en posición inclinada con mucho fondo.

2.2.5. MEDIOS PARA LA IDENTIFICACION DE MICROCOCCUS Y STAPHYLOCOCCUS

Medio de Hugh-Leifson, modificado por Baird-Parker.

Composición:

Triptona	10 g.
Extracto de levadura	1 g.
Glucosa	10 g.
Púrpura de bromocresol	0,04 g.
Agar	10 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,2; se esteriliza en autoclave a 115°C durante 20 minutos. Se envasa en tubos de 180x9 mm.

Medio de tioglicolato.

Composición:

Triptona (digerido pancreático de caseína)	15 g.
Extracto de levadura	5 g.
L-Cisteína	0,5 g.
Glucosa	5,5 g.
Cloruro sódico	2,5 g.
Tioglicolato sódico	0,5 g.
Agar	3 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,1 a 25°C; se esterilizó en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

Medio Agar P.

Composición:

Triptona	5 g.
Extracto de levadura	5 g.
Cloruro sódico	5 g.
Glucosa	1 g.
Agar	15 g.

Agua destilada 1.000 ml.

El pH es 7, 2; se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos; después tender placas.

Medio de Glicerol-Eritromicina.

Composición:

Extracto de levadura	2 g.
Glicerol	10 ml.
Púrpura de bromocresol	0,04 g.
Fosfato amónico	1 g.
Cloruro potásico	0,2 g.
Sulfato magnésico. 7 H ₂ O	0,2 g.
Agar	9 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7; se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos, después se deja enfriar a 45°C-50°C y se añade 1 ml. de solución de eritromicina 0,4 mg./ml. Tender placas.

Medio para la fosfatasa.

Composición:

Medio Agar P (2. 2. 5.) 1.000 ml.

Añadir 1 ml. de la solución de difosfato sódico de fenoftaleina 10% al medio cuando está atemperado a 45°C-50°C, después tender placas.

Medio para DNA sa

Composición:

ADN	0,3 g.
Agar	10 g.
Cloruro cálcico anhidro 0,01 M.	1 ml.
Buffer Tris a pH 9; 0,05 M	1.000 ml.

Calentar hasta ebullición para disolver los componentes y cuando esté a 45°C-50°C se añaden 3 ml. de azul de toluidina 0,1 M , se mezcla todo bien y se tienden placas.

Agar triptona-extracto de levadura.

Composición:

Triptona	10 g.
Extracto de levadura	1 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7; se esteriliza en autoclave a 115°C durante 20 minutos, tender placas.

Medio para la fermentación de la xilosa.

Composición:

Medio de Hugh-Leifson modificado por Baird-Parker, ya descrito en (2.2.5.), con 15 g. de agar por cada 1000 ml. de medio.

El azúcar se adiciona al medio en la proporción del 1% previamente esterilizado por filtración y cuando el medio esté atemperado a 45°C-50°C.

Agar sangre bovina.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Cloruro sódico	5 g.
Peptona	10 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final es 7; se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos, se deja enfriar a 45°C-50°C y se añade estéril-

mente la sangre bovina en la proporción del 5-10%, después tender placas.

Caldo Arginina.

Composición:

Triptona	10 g.
Extracto de levadura	1 g.
Extracto de carne	5 g.
Clorhidrato de L-Arginina	3 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7; se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Caldo infusión cerebro-corazón.

Composición:

Infusión 200 g. con cerebro de ternera.	
Infusión 250 g. con corazón de buey.	
Proteosa-peptona	10 g.
Glucosa	2 g.
Cloruro sódico	5 g.
Fosfato sódico	2,5 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,4; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2.6. MEDIOS PARA LA IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS

Agar sangre.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Cloruro sódico	5 g.
Peptona	10 g.
Agar	15 g.

Agua destilada 1.000 ml.

El pH final es 7, se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos, cuando esté atemperado a 45°C-50°C se añade estérilmente de 5-10% de sangre de caballo, después se tienen placas.

Caldo glucosado.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Cloruro sódico	5 g.
Peptona	10 g.
Glucosa	5 g.
Agua destilada	1.000 ml.

El pH final del medio es $7 \pm 0,2$. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Se reparte en tubos.

Leche de Sherman.

Composición:

Leche esterilizada	9 ml.
Solución de azul de metileno 1%	1 ml.

Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Caldo con 6,5% de cloruro sódico.

Composición:

Infusión de extracto de carne	1.000 ml.
Peptona	15 g.
Cloruro sódico	65 g.

El pH final se ajustó a 9,6. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Medio de fermentación de azúcares.

Composición:

Extracto de carne	1 g.
Peptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Rojo de fenol	0,018 g.
Agar	1 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,6. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Los azúcares utilizados, sorbitol y arabinosa, se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio base estéril a la temperatura de 45°C-50°C en la proporción 0,5%

Agar sangre con 40% de bilis de buey.

Composición:

Extracto de carne	3 g.
Cloruro sódico	5 g.
Peptona	10 g.
Bilis de buey	400 g.
Agar	18 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7,6. Se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. Se añadió estérilmente de 5 a 10 ml. de sangre al medio a-temperado a la temperatura de 45°C-50°C.

Caldo arginina

Composición:

Peptona	5 g.
Extracto de carne	5 g.
Piridoxal	0,005 g.
Solución acuosa de púrpura de bromocresol al 0,002%	5 ml.
Solución acuosa de rojo cresol al 0,002%	2,5 ml.

Glucosa	0,5 g.
Clorhidrato de L-Arginina	10 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es de 6. Se esterilizó a 120°C durante 20 minutos.

Agar esculina.

Composición:

Agua de peptona	100 ml.
Esculina	0,1 g.
Citrato férrico	0,05 g.
Agar	1 g.

El pH final del medio es 7,4. Se esterilizó a 115°C durante 15 minutos. Se reparte en tubos, dejando enfriar en posición inclinada.

Caldo hipurato.

Composición: Hipurato sódico	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Sulfato magnésico. 7 H ₂ O	0,2 g.
Fosfato amónico	1 g.
Fosfato bipotásico	1 g.
Rojo de fenol 0,2%	5 ml.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 6,8-7. Se esterilizó en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

2.3. SOLUCIONES, REACTIVOS Y VARIOS.

Solución cristal violeta oxalatada.

Composición:

Cristal violeta	2 g.
Alcohol 95º	20 ml.
Oxalato amónico al 1%	80 ml.

Solución yodo-yodurada.

Composición:

Yoduro potásico	2 g.
Yodo	1 g.
Agua destilada	300 ml.

Solución de safranina

Composición:

Safranina	0,25 g.
Alcohol 95º	10 ml.
Agua destilada	100 ml.

Solución de verde malaquita.

Composición:

Verde malaquita	5 g.
Agua destilada	100 ml.

Azul de lactofenol

Composición:

Lactofenol	0,5 g.
Azul-algodón	100 ml.

Solución de tampón fosfato.

Composición:

Solución madre

Fosfato monopotásico	34 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se ajusta el pH a $7,2 \pm 0,1$ con sosa. Para utilizar la solución se suspende 1 ml. de la solución madre en 800 ml. de

agua destilada y se adiciona 0,3% de Tween 80. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Líquido de lavado.

Composición:

Peptona	10 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final es 7. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solución tampón fosfato 0,02 M

Composición:

- Solución A 1/15 M

Fosfato monopotásico	9,08 g.
Agua destilada	1000 ml.

- Solución B 1/15 M

Fosfato disódico	11,88 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se toman 39,2 ml. de la solución A 1/15 M y se completan hasta 333 ml. con la solución B 1/15 M

Solución de alfa-naftilamina.

Composición:

Alfa-naftilamina	5 g.
Acido acético 5N	1000 ml.

Solución de ácido sulfanílico.

Composición:

Acido sulfanílico	8 g.
Acido acético 5N	1000 ml.

Solución de alfa-naftol.

Composición:

Alfa naftol	6 g.
Alcohol 60º	100 ml.

Solución de hidróxido sódico.

Composición:

Hidróxido sódico	16 g.
Agua destilada	100 ml.

Solución de lisostafina.

Composición:

Lisostafina liofilizada (Sigma)	5 mg.
Cloruro sódico	1 g.
Tampón fosfato 0,02 M	100 ml.

Solución de yema de huevo.

Composición:

Solución salina estéril a pH 7	250 ml.
--------------------------------	---------

Una yema de huevo tomada en condiciones estériles, se suspende y homogeniza bien antes de utilizar. Se conserva a 4°C

Reactivo de Nessler.

Composición:

Yoduro potásico	8 g.
Yoduro mercurico	11,5 g.
Sosa 6N	50 ml.
Agua destilada	50 ml.

Se utiliza después de 24 horas de su preparación. El agua que se utiliza ha de estar libre de amoníaco

Reactivo de Frazier.

Composición:

Cloruro de mercurio	15 g.
Acido clorhidrico concentrado	20 ml.
Agua destilada	100 ml.

Reactivo de Erlich.

Composición:

Paradimetil amino benzaldehido	1 g.
Alcohol 95º	95 ml.
Acido clorhidrico concentrado	20 ml.

Solución de Cloruro férrico.

Composición:

Cloruro férrico. 6 H ₂ O	12 g.
Acido clorhidrico concentrado	2,5 ml.
Agua destilada	100 ml.

Alcohol de 90º.

Alcohol de 70º.

Agua destilada estéril pH 7.

Solución de ácido clorhídrico N.

Solución de hidróxido amónico.

Agua oxigenada de 10 volúmenes.

Vaselina líquida estéril.

Plasma coagulasa liofilizada (Difco).

Discos estériles de 6 mm. de diámetro (Difco).

Discos de Novobiocina de 5 microgramos (Difco).

Discos de Bacitracina (Difco),

Filtros de membrana Millipore de 47 mm. de diámetro y 0,45 micras de tamaño de poro.

Sobres generadores de hidrógeno y CO₂, marca "Gaspak"

Indicador de anaerobiosis, marca "Gaspak".

2.4. METODOS

2.4.1. TOMA DE MUESTRAS.

Las normas que se han seguido en este trabajo para la toma de muestras son las recomendadas por la USP XIX, (189) para el examen microbiológico de los preparados farmacéuticos. El muestreo se ha realizado tomando al azar 3 muestras de un mismo lote del preparado farmacéutico. Cada una de estas muestras estaba formada por 10 unidades del mismo lote. Para el análisis microbiológico se han tomado 10 g. o 10 ml., según sean preparados sólidos o líquidos, cogiendo 1 g. o 1 ml. de cada uno de los diez envases individuales, tomados con las adecuadas condiciones de esterilidad.

Según el tipo de envase se ha procedido de diferente forma:

- En los comprimidos, cápsulas y polvos que estaban envasados en tiras de papel de aluminio plastificado o bien en estuches de plástico y papel de aluminio, antes de tomar el contenido de estos envases se ha desinfectado la superficie externa con alcohol de 70º y después se abrieron los envases con ayuda de tijeras estériles. Para la realización de la pesada nos ayudamos de pinzas y espátula estéril.

- Para los jarabes y soluciones, tanto si el recipiente era de vidrio o plástico, una vez desinfectado con alcohol de 70º el tapón, se flameó la boca antes de tomar la muestra con pipeta estéril.

Todas las operaciones se realizaron en cabina de flujo laminar o en vitrina con lámpara germicida. Se determinó la a_w en un aparato marca Lufft.

2.4.2. PREPARACION DE LA MUESTRA.

Después de la toma de muestra se siguieron todas las precauciones microbiológicas para que tanto el número como el tipo de microorganismos, que podían estar presentes, en los preparados farmacéuticos no experimentaran modificaciones.

Los preparados farmacéuticos sólidos, que no eran solubles fácilmente, fue necesario disgregarlos previamente.

- Los comprimidos y grageas se pulverizaron con la ayuda de un mortero estéril.

- Las cápsulas se suspendieron en el diluyente, y se agitaron mecánicamente durante 1 - 2 minutos en un "Stomaker".

Preparación de las diluciones.

Los 10 g. o 10 ml. de muestra tomados en las condiciones ya mencionadas, se suspendieron en 90 ml. de solución tampón (2.3.) contenidos en un matraz, que previamente se había atemperado a 40°C; obteniéndose la dilución inicial 10^{-1} , y a partir de ella se hicieron diluciones decimales. De la dilución 10^{-1} , bien homogeneizada por agitación mecánica, se tomó 1 ml. con pipeta estéril y se suspendió en 9 ml. de solución tampón (2,3.); y así obtuvimos la dilución 10^{-2} ; las siguientes diluciones se realizaron de forma análoga.

2.4.3. DETERMINACION DEL PH.

El pH de los preparados farmacéuticos sólidos como: comprimidos, grageas, cápsulas, polvos, granulado y extracto fluído se realizó suspendiendo o disolviendo 1 g. de la muestra en 9 ml. de agua estéril a pH 7, tomando una parte alícuota de esta suspensión, según AOAC (184), se determinó el pH en un peachímetro.

Para los preparados farmacéuticos líquidos como: jarabes y soluciones, la determinación del pH se hizo directamente, tomando una parte del mismo y la lectura se hizo en el peachímetro.

Cuando el pH obtenido en la lectura no fue próximo a la neutralidad, para evitar alteraciones del pH en los medios de cultivo que podían influir en el posterior desarrollo de los microorganismos presentes, se ajustó el pH (84).

2.4.4. RECUENTO DEL NUMERO DE MICROORGANISMOS.

Debido a la ausencia de métodos propios en los tratados oficiales de nuestro país, se ha realizado el examen por distintos métodos, que han sido recomendados por diversos autores y Farmacopeas (38)(41)(54)(60)(83)(84)(168)(175)(189).

- . Método de recuento por dilución en placa.
- . Método del número más probable (NMP).
- . Método de filtración a través de membrana.

Los métodos de recuento por dilución en placa y el del número más probable se han realizado en todos los preparados farmacéuticos estudiados. Aunque el método de dilución en placa se recomienda para muestras solubles y con alto grado de contaminación, en nuestro caso ha sido utilizado en todos los preparados farmacéuticos debido al desconocimiento del grado de contaminación microbiana.

El método de filtración a través de membrana se ha empleado para los jarabes y soluciones y no se ha utilizado en el resto de los preparados, que eran insolubles.

2.4.4.1. Método de recuento por dilución en placa.

2.4.4.1.1. Recuento de bacterias viables aerobias mesófilas.

Se ha sembrado 1 ml. de las distintas diluciones, por duplicado, en placas Petri estériles y a continuación se añadió de 15 a 20 ml.

de agar triptona-soja (2.2.1.), y una vez solidificado se incubó a la temperatura de 30°C-33°C durante 72 horas. Después se hizo el recuento de colonias, haciendo la media aritmética y se calculó el número de bacterias por g. o ml. de muestra.

2.4.4.1.2. Recuento de bacterias esporuladas aerobias mesófilas.

Se siguió la misma técnica que en 2.4.4.1.1., pero previamente se calentó la dilución inicial 10^{-1} en un baño a la temperatura de 80°C durante 10 minutos, y luego a partir de esta dilución calentada se hicieron las siguientes diluciones decimales, 10^{-2} y 10^{-3} . Los recuentos y cálculos se hicieron igual que 2.4.4.1.1.

2.4.4.1.3. Recuento de bacterias anaerobias mesófilas.

Se siguió la misma técnica de siembra que en 2.4.4.1.1. utilizando agar infusión cerebro-corazón y la incubación se hizo en jarra de anaerobiosis utilizando el sistema GasPak, y se incubó a la temperatura de 30°C-33°C durante 5 días.

Los recuentos y cálculos se hicieron como 2.4.4.1.1.

2.4.4.1.4. Recuento de bacterias esporuladas anaerobias mesófilas.

Se siguió la misma técnica que 2.4.4.1.2., la incubación se realizó como 2.4.4.1.3.

Los recuentos y cálculos se hicieron igual que 2.4.4.1.1.

2.4.4.1.5. Recuento de mohos y levaduras.

Se ha sembrado 0,1 ml. de las distintas diluciones, por duplicado, en la superficie de placas con medio agar OGA (2.2.1.), extendiéndose la muestra sembrada con asa de Digralsky. La incubación se hizo a la temperatura de 25°C durante 5 días, para los cálculos se hizo el recuento de colonias haciendo la media aritmética y se expresó el resultado de mohos y levaduras por g. o ml. de muestra.

2.4.4.2. Método del número más probable (NMP).

2.4.4.2.1. Recuento de bacterias viables aerobias mesófilas.

Se prepararon 5 series de 3 tubos con 9 ml. de caldo tripton-soja (2.2.1.). En la 1ª serie se sembró 1 ml., con pipeta estéril, de la dilución inicial 10^{-1} , se homogeneizó bien, por agitación mecánica, y de cada tubo de ésta primera serie se sembró 1 ml. a los tubos de la 2ª serie (dilución 10^{-2}), y así se procedió hasta sembrar la 4ª serie (dilución 10^{-4}); la 5ª serie sirvió de control del medio de cultivo, no debe presentar crecimiento después de la incubación.

Se incubó a la temperatura de 30°C-33°C durante 72 horas y se consideraron positivos los tubos que presentaban crecimiento (turbidez, sedimento, velo), comprobando la presencia de microorganismos por un examen al microscopio para evitar falsas positividades. El resultado se expresó por el NMP por g. o ml. de muestra, consultando las tablas de la APHA (4).

2.4.4.2.2. Recuento de bacterias esporuladas aerobias mesófilas.

Se siguió la misma técnica que en 2.4.4.2.1., pero se sembró 1 ml. de la dilución inicial 10^{-1} , previamente calentada a la temperatura de 80°C durante 10 minutos. El resultado se expresó igual que 2.4.4.2.1.

2.4.4.3. Método de filtración a través de membrana.

La filtración se ha realizado en cabina de flujo laminar vertical, para asegurar las condiciones de esterilidad.

El equipo de filtración utilizado ha sido de la marca "Millipore", el soporte del filtro es de vidrio "pirex" de 47 mm. de diámetro y se esterilizó en autoclave a 124°C durante 30 minutos. Los filtros de membrana de acetato de celulosa eran de un tamaño de poro de

0,45 micras. Para facilitar la filtración el equipo se conectó a una bomba de vacío.

Preparación de la muestra:

Los frascos de jarabe y soluciones, previamente homogeneizados por agitación manual, se abrieron y se tomó 1 ml. y 10 ml., que se suspendieron en dos matraces con 99 ml. y 90 ml. de solución tampón (2.3.) que previamente se había atemperado a la temperatura de 40°C.

Antes de realizar la filtración se dejaron los matraces durante 1 hora a la temperatura del laboratorio; para favorecer la revivificación de los microorganismos.

2.4.4.3.1. Recuento de bacterias viables aerobias mesófilas.

Se filtró el contenido de cada matraz, previamente homogeneizado y posteriormente se lavó el filtro 3 veces sucesivas con 100 ml. de líquido lavador (2.3.) con el fin de eliminar la presencia de sustancias antimicrobianas. Después con la ayuda de pinzas estériles se depositó el filtro sobre la placa Petri con medio de agar triptona-soja (2.2.1.). La incubación se hizo a la temperatura de 30°C-33°C durante 72 horas, después se hizo el recuento de colonias de cada filtro, haciendo la media aritmética y se expresó el número de bacterias por mililitro de muestra.

2.4.4.3.2. Recuento de bacterias esporuladas aerobias mesófilas.

Se siguió la misma técnica que en 2.4.4.3.1., pero previamente se calentó el volumen a filtrar en las mismas condiciones indicadas en 2.4.4.1.2.

Los resultados y cálculos se hicieron igual que en 2.4.4.3.1.

2.4.4.3.3. Recuento de bacterias anaerobias mesófilas.

Se siguió la misma técnica que en 2.4.4.3.1., pero la in-

incubación se hizo en jarra de anaerobiosis, utilizando el sistema "Gas-Pak", a la temperatura de 30°C-33°C durante 5 días.

Los resultados y cálculos se hicieron igual que en 2.4.4.

3.1.

2.4.4.3.4. Recuento de bacterias esporuladas anaerobias mesófilas.

Se siguió la misma técnica que en 2.4.4.3.1., pero previamente se calentó el volumen a filtrar en las mismas condiciones indicadas en 2.4.4.1.2.

La incubación se hizo igual que en 2.4.4.3.3. y los resultados y cálculos se hicieron igual que en 2.4.4.3.1.

2.4.4.3.5. Recuento de mohos y levaduras.

Se siguió la misma técnica que en 2.4.4.3.1., empleando como medio de cultivo Agar OGA(2.2.1.) pero la incubación se hizo a la temperatura de 25°C durante 5 días; los resultados y cálculos se hicieron igual que en 2.4.4.3.1.

2.4.5. INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS PATOGENOS.

Se han seguido los métodos recomendados por diversos autores, organismos y Farmacopeas (8) (38) (41) (60) (83) (84) (168) (175) (189).

2.4.5.1. Escherichia coli

-Enriquecimiento:

Se hizo en 90 mililitros de caldo lactosa (2.2.3.) contenidos en un matraz con campana de Dürham, para observar la formación de gas a partir de la lactosa. Se sembraron 10 gramos o 10 mililitros de muestra y la incubación se hizo a la temperatura de 35°C-37°C durante 48 horas.

-Aislamiento:

Se sembró, del cultivo que había producido gas, con asa de cultivo en medio Mac Conkey (2.2.3.) y después incubó a la tempe-

ratura de 35°C-37°C durante 24 horas.

2.4.5.2. Salmonella y Shigella

- Preenriquecimiento:

Se hizo en caldo lactosa (2.2.3.), en un matraz con 90 ml. de medio. Se sembraron 10 g. o 10 ml. de muestra y se incubaron a la temperatura de 37°C durante 48 horas.

- Enriquecimiento:

Se sembró 1 ml. del cultivo de preenriquecimiento en dos tubos con caldo selenito y en otros dos con caldo tetracionato. Se incubó a la temperatura de 37°C durante 24 horas.

- Aislamiento:

Se hizo en medios diferenciales como agar Mac Conkey (2.2.3.) y selectivos como agar verde brillante-rojo de fenol (2.2.3.) y agar Salmonella Shigella (SS) (2.2.3.). Se sembró del cultivo de enriquecimiento en la superficie de placas con estos medios, para ver si había formación de colonias incoloras y translúcidas, propias de microorganismos no fermentadores de lactosa.

2.4.5.3. Pseudomonas aeruginosa

- Enriquecimiento:

Se sembraron 10 g. o 10 ml. de muestra en un matraz con 90 ml. de caldo tripton-soja (2.2.3.) y se incubaron a la temperatura de 37°C durante 48 horas.

- Aislamiento e identificación:

Se sembró del cultivo de enriquecimiento, con asa de cultivo, en la superficie de placas con medio agar King A (2.2.3.) para exaltar la producción de pirocianina y se incubó a la temperatura de 37°C durante 48 horas. El pigmento producido en estas condiciones se extrajo con cloroformo. Otra asa de cultivo se sembró en agar King B

(2.2.3.) para poner de manifiesto la producción de fluoresceína, incubando a la temperatura de 37°C durante 24 horas, seguida de una incubación durante 3 días a la temperatura del laboratorio (117).

En las placas que presentaron crecimiento, aunque no daban las colonias la coloración típica, se hizo tinción de Gram.

2.4.5.4. Staphylococcus aureus.

- Enriquecimiento:

Se realizó en un matraz con 90 ml. de caldo triptona-soja con cloruro sódico (2.2.3.), se sembraron 10 g. o 10 ml. de muestra y se incubó a la temperatura de 37°C durante 48 horas.

- Aislamiento:

Del cultivo de enriquecimiento se tomó con asa de cultivo y se sembraron por estría en la superficie de placas con medio agar Baird-Parker (2.2.3.). Se incubó a la temperatura de 37°C durante 24 horas. Se observó si había presencia de colonias típicas: de tamaño pequeño, color negro y aspecto brillante debido a la reducción del telurito a telurito metálico y con un halo claro y opaco alrededor de la colonia por la precipitación de la lecitina.

2.4.5.5. Streptococcus faecalis.

- Enriquecimiento:

Se hizo en caldo glucosa-azida (2.2.3.), en un matraz con 90 ml. de medio, se sembraron 10 g. o 10 ml. de muestra y se incubó a la temperatura de 37°C durante 48 horas.

- Confirmación:

Se utilizó como medio selectivo el medio de Lisky o caldo EVA (2.2.3.), se sembró 1 ml. del cultivo de enriquecimiento y se incubó a la temperatura de 37°C durante 24 horas, para ver si produce turbidez y un sedimento de color violáceo debido al crecimiento de Streptococcus faecalis.

2.4.6. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.

2.4.6.1. Microorganismos aerobios.

Se realizó a partir de los recuentos con crecimiento. Se tomaron, con asa de cultivo, aquellas colonias que presentaban aspecto y caracteres morfológicos diferentes. La resiembra se hizo, por estría en superficie en placas de agar triptona-soja (2.2.1.) y se incubó a la temperatura de 30°C-33°C durante 24 horas, para comprobar que el microorganismo estaba en cultivo puro. Para su conservación se sembraron tubos con medio agar triptona-soja inclinado para proceder a su posterior identificación.

2.4.6.2. Microorganismos anaerobios.

Los microorganismos se aislaron de las placas (2.2.1.) incubadas en anaerobiosis. Para comprobar si el microorganismo era anaerobio estricto o facultativo se tomó de la placa de aislamiento, con pipeta Pasteur estéril cerrada y se inoculó en el medio VL para cultivo en profundidad (2.2.2.), previamente regenerado en baño maría y atemperado a la temperatura de 45°C - 50°C. Se incubó a la temperatura de 30°C - 33°C durante 24 - 48 horas.

Solamente se sembraron para su identificación las cepas que crecieron en anaerobiosis estricta.

2.4.6.3. Aislamiento de mohos y levaduras.

Se realizó a partir de los recuentos con crecimiento.

Se tomaron con asa micológica, las colonias de aspecto cre-

moso que podían ser levaduras y se resembraron en agar Sabouraud (2.2.2.) y se hizo lo mismo con las colonias que tenían aspecto filamentosos. La incubación se realizó a la temperatura de 25°C durante 5 días.

2.4.7. IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS.

2.4.7.1. Bacillus.

Se han seguido los criterios de clasificación de Smith y Gordon (178) Wolf y Barker (199) Cowan y col. (55) Barjac y Bonnefoi (15) Lemille y col. (130) y la 8ª edición del Manual Bergey (37). Para facilitar la identificación hemos empleado una clave, utilizando pruebas bioquímicas, tomada de Ramos Cormenzana (165) y modificada por nosotros (Cuadro II - 1)

Para la comprobación de todos los caracteres, tanto morfológicos como bioquímicos, del género Bacillus, después de aislados se realizó:

- Observación morfológica de la colonia.

Se hizo sembrando el microorganismo, por estría en superficie en placas con agar extracto de suelo (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 24 horas, después se hizo la observación de las colonias con lupa y se anotaron los caracteres: pigmentación, borde liso o rugoso, con o sin brillo.

- Observación de la morfología del bacilo.

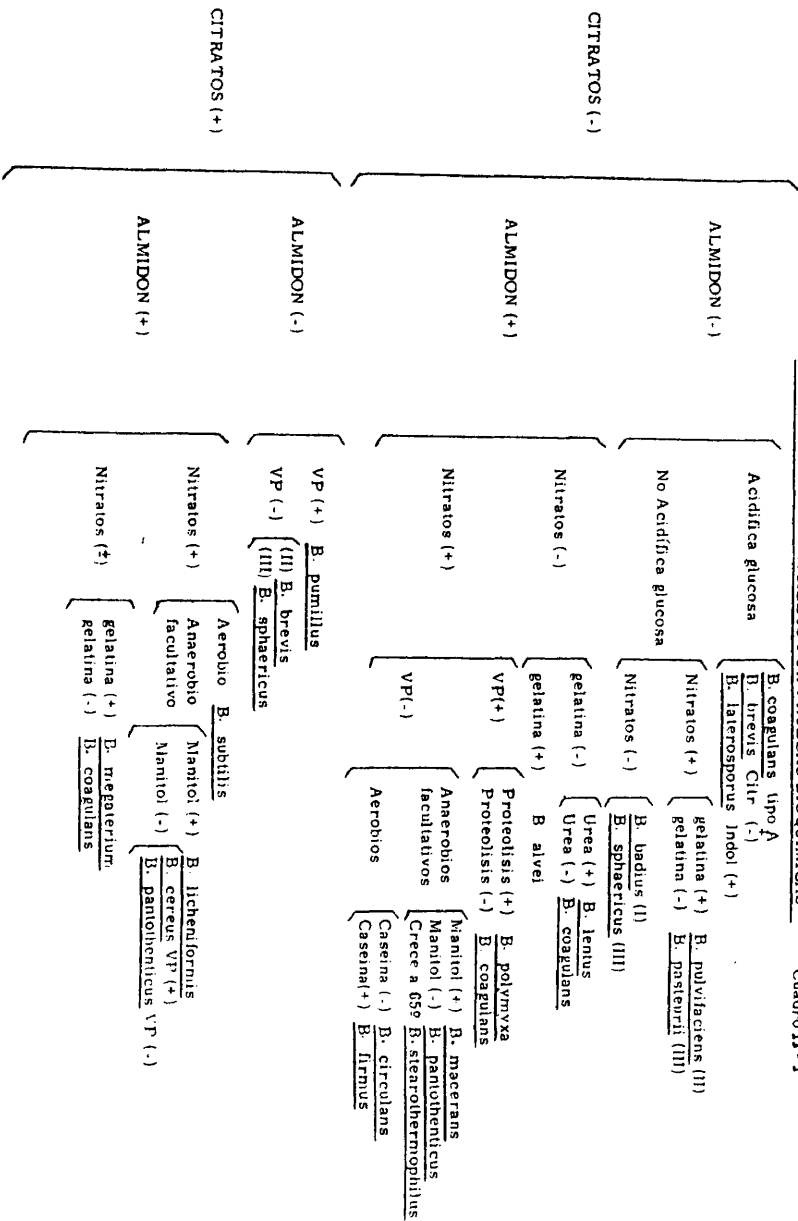
Se hizo por tinción de Gram, ya que esta técnica de coloración además de diferenciar los microorganismos en dos grandes grupos: Gram positivos y Gram negativos, también permite ver la forma y tamaño de la célula vegetativa.

- Observación de la morfología del esporangio.

Se hizo por tinción de esporas siguiendo el método Wirtz

CLASIFICACION DE BACILLUS POR PRUEBAS BIOQUIMICAS

Cuadro II - 1



modificado (93) y se realizó a partir de cultivos de agar extracto de suelo (2.2.4.), después de incubar 72 horas a la temperatura de 30°C. Así se vió el tamaño, forma y situación de la espora.

- Movilidad. (46)

Se determinó haciendo la siembra de cada cepa en agar movilidad (2.2.4.), con hilo de cultivo, en picadura, y se incubó a la temperatura de 30°C durante 24 horas. Observando si el crecimiento se extendió fuera de la picadura.

- Prueba de la catalasa (103)

Se empleó la técnica en porta objetos, con agua oxigenada de 10 volúmenes. Se consideraron bacterias catalasa positivas, las que produjeron desprendimiento de oxígeno a partir del agua oxigenada y negativas las que no lo producen.

En cuanto a las pruebas bioquímicas se han seguido las técnicas de Buttiaux (46)

- Observación del tipo respiratorio.

Se hizo sembrando con pipeta Pasteur, con movimientos helicoidales a lo largo del tubo de arriba a abajo y de abajo a arriba, en medio VL para cultivo en profundidad (2.2.2.), previamente regenerado y atemperado a la temperatura de 45°C-50°C. La incubación se hizo a la temperatura de 30°C durante 24-48 horas.

-- Aerobio estricto: cuando sólo existe crecimiento en la parte superficial del medio.

-- Anaerobio facultativo: cuando hay crecimiento a lo largo de todo el tubo.

-- Anaerobio estricto: cuando sólo crece en el fondo del tubo.

-- Microaerofilo: cuando crece en una pequeña zona intermedia próxima a la superficie, pero no existe crecimiento en la superficie.

- Fermentación de los azúcares.

Se hizo en los siguientes azúcares: glucosa, arabinosa, xilosa, manitol, lactosa y sacarosa.

Con asa de cultivo se inoculó el microorganismo en picadura y en el plano inclinado del medio de fermentación de azúcares (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 1 a 6 días. Se consideró positiva la fermentación de azúcares en los tubos que habían virado el indicador de violeta a amarillo.

- Presencia de ureasa.

Se sembró el microorganismo por picadura y por estría en el plano inclinado del medio agar urea de Christensen (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 1 a 6 días. La presencia de ureasa, que hidroliza la urea con formación de amoníaco, se puso de manifiesto cuando el indicador rojo púrpura viró a color rojo cereza por un cambio de pH hacia la zona básica. Sin embargo se consideraron negativos cuando hay un cambio de color a amarillo debido a la producción de sustancias ácidas a partir de la glucosa.

- Desaminación de la fenil alanina.

Se sembró el microorganismo por estría en superficie en el plano inclinado del medio de agar fenil alanina (APP) (2.2.4.) y se incubó a la temperatura de 30°C durante 24 horas. El ácido fenil pirúvico, producido por desaminación de la fenil alanina, se puso de manifiesto con solución de cloruro férrico (2.3.), añadiendo 5 a 6 gotas sobre el plano inclinado, y se consideró positivo cuando hay aparición de color verde.

- Utilización de los Citratos.

Se observó inoculando el microorganismo en el plano inclinado de un tubo con agar citrato de Simons (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 1 a 10 días. Si el microorganismo utiliza los

citratos se produce una alcalinización del medio y hay un cambio de color de verde a azul; en el caso de que no utilice los citratos del medio, permanece de color verde.

- Hidrólisis de la gelatina.

Se puso de manifiesto inoculando placas con medio agar gelatina de Frazier (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 4 a 8 días. Se consideró gelatinasa positivo, cuando al añadir sobre la colonia formada, el reactivo de la gelatinasa (2.3.) se produce una zona clara alrededor de la colonia, y negativa si no aparece esa zona clara.

- Hidrólisis del almidón.

Se observó inoculando el microorganismo en el centro de una placa con medio agar almidón (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 1 a 8 días. Se consideró positiva la hidrólisis del almidón, cuando al añadir 4 a 6 gotas de solución yodo-yodurada (2.3.) sobre la colonia desarrollada, apareció una zona clara frente al color violeta intenso que se produce cuando el almidón no ha sido hidrolizado.

- Digestión de la caseína.

Se observó inoculando el microorganismo en el centro de una placa con medio agar caseína (2.2.4.) y se incubó a la temperatura de 30°C durante 1 a 8 días. La digestión de la caseína se consideró positiva cuando alrededor de la colonia aparecía un halo claro, y negativa cuando no daba dicho halo.

- Producción de indol.

Se investigó inoculando el microorganismo en un tubo con caldo de peptona (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 24 a 48 horas. La presencia de indol se puso de manifiesto cuando al

añadir 1 ml. de reactivo de Erlich (2.3.) resbalando por las paredes del tubo sin agitar, apareció un anillo rojo en la zona de contacto entre el reactivo y el medio de cultivo, y negativa si no daba este anillo rojo.

- Producción de acetoína.

Se investigó inoculando el microorganismo en un tubo de medio de Smith (2.2.4.). Se incubó a la temperatura de 30°C durante 48 horas. La producción de acetoína se puso de manifiesto mediante la reacción de Barritt, añadiendo 0,5 ml. de solución de alfa naftol (2.3.) y 1 ml. de solución de hidróxido sódico (2.3.), se agitó enérgicamente durante 10 minutos. Si aparece color rosado la reacción es positiva y negativa cuando no hay aparición de color.

- Reducción de los nitratos.

Se investigó inoculando el microorganismo en un tubo de caldo nitrado (2.2.4.) y se incubó a la temperatura de 30°C durante 24 horas. Para investigar los nitritos se añadió unas 3 a 4 gotas de solución de ácido sulfanílico (2.3.) y de solución de alfa naftilamina (2.3.). En caso positivo aparece una coloración rojo ladrillo; cuando no dió coloración se consideró negativa y se comprobó la presencia de nitratos en el medio añadiendo una pequeña cantidad de polvo de zinc.

2.4.7.2. Cocos Gram positivos.

Para su identificación se hicieron las siguientes pruebas generales:

- Observación morfológica de la colonia:

Se realizó sembrando el microorganismo por estría en superficie, con asa de cultivo, en el medio de agar triptona-extracto de levadura (2.2.5.). Se incubó a la temperatura de 37°C durante 24-48 horas. Se hizo la observación de las colonias con lupa para observar los diferentes caracteres morfológicos.

- Observación morfológica de la célula vegetativa.

Del mismo cultivo anterior se hizo tinción de Gram para ver el tamaño, forma y agrupamiento.

- Prueba de la catalasa.

Descrita en 2.4.7.1. Mediante esta prueba se han diferenciado los microorganismos en: catalasa negativa (Streptococcus) y catalasa positiva (Staphylococcus y Micrococcus).

2.4.7.2.1. Familia Micrococaceae.

La diferenciación de los géneros Micrococcus y Staphylococcus se ha realizado siguiendo los criterios de Baird-Parker (9) (10) (11) (12) Evans y Kloos (74), Kloos y Schleifer (118) (119), Schleifer y Kloos (173) (174) y del Comité Internacional de Sistemática (112), que se basan en la determinación de la capacidad oxidativa o fermentativa de la glucosa, en la sensibilidad o no a lisostafina y en la producción de ácido a partir de glicerol.

- Fermentación anaerobia de la glucosa.

Se sembraron dos tubos de medio Hugh-Leifson modificado por Baird-Parker (11) (2.2.5.), con pipeta Pasteur de abajo a arriba y con gran cantidad de inóculo a partir de un cultivo de 24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.). El medio previamente se había regenerado y atemperado a 45°C-50°C. Inmediatamente después de sembrados se enfriaron los dos tubos y uno de ellos se recubrió con vaselina estéril. Se incubaron a la temperatura de 37°C durante 1 a 5 días.

La producción de ácido a partir de glucosa por vía fermentativa se observó en el tubo recubierto con vaselina, por un cambio de color en el indicador y la producción de ácido a partir de la glucosa por vía oxidativa se vió en el tubo sin recubrir, igualmente por un cambio de color en el indicador de violeta a amarillo.

- Tipo de crecimiento en medio tioglicolato (74).

Antes de sembrar el medio se eliminó el oxígeno disuelto en él por ebullición y se atemperó a la temperatura de 45°C-50°C. Se inoculó el medio con una gota de un cultivo de 24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.), y después de sembrar se dejó solidificar a la temperatura del laboratorio. Se incubó a la temperatura de 37°C durante 3 a 7 días. Esta prueba se sembró para las cepas no fermentadoras de la glucosa y las que dan una fermentación débil. Los resultados del crecimiento se observaron a la luz de una lámpara y se anotaron la localización y la intensidad de las zonas de crecimiento.

- Sensibilidad a lisostafina (124)

Se utilizó un cultivo de 18-24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.). Se observó la sensibilidad a lisostafina poniendo en un tubo 0,1 ml. de tampón fosfato 0,02 M (2.3.) y 0,1 ml. del cultivo en caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.) frente a un tubo testigo que contenía 0,1 ml. del tampón fosfato 0,02 M (2.3.) y 0,1 ml. del caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.). Se incubaron a 37°C y la observación del resultado se hizo cada 30 minutos dándose por negativa la prueba cuando al cabo de 24 horas no existía aclaramiento, frente al testigo que permanecía turbio.

- Producción de ácido a partir de glicerol (173)

Se inocularon placas del medio glicerol-eritromicina (2.2.5.) con asa de cultivo por estría en superficie, a partir de un cultivo de 24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.). Se incubaron a la temperatura de 37°C durante 1 a 5 días.

Se consideró positiva la producción de ácido a partir del glicerol cuando había un cambio de coloración de violeta a amarillo, alrededor de las colonias, y negativa cuando el medio no cambió de color.

2.4.7.2.1.1. Micrococcus.

Las especies de este género se identificaron según la clasificación de la 8ª edición del Manual Bergey (37), y Kloos (120) realizándose las siguientes pruebas:

- Producción de amoniaco a partir de arginina (9)

Se inoculó el caldo arginina (2.2.5.) con pipeta Pasteur de un cultivo de 24 horas de caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.). Se incubó a la temperatura de 37°C durante 24 horas. La producción de amoniaco se detectó tomando 1 ml. del medio incubado y añadiendo 0,5 ml. de reactivo de Nessler (2.3.). En caso positivo apareció una coloración anaranjada.

- Sensibilidad a novobiocina (5 microgramos) (119)

Se inocularon placas de medio agar P (2.2.5.) depositando con pipeta Pasteur una gota de un cultivo de 24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2.2.5.) y encima de la gota se depositó un disco de novobiocina de 5 microgramos. Se incubaron a la temperatura de 37°C durante 24 horas. Se consideraron resistentes a novobiocina cuando el diámetro de inhibición fue de 1 a 5 mm.

- Producción de ácido a partir de xilosa (119)

Se empleó el medio para la fermentación de la xilosa (2.2.5.). Se inoculó, con asa de cultivo por estría en superficie, incubándose a la temperatura de 37°C durante 24-48 horas. La fermentación de la xilosa se puso de manifiesto cuando aparecía un cambio de coloración en el medio de violeta a amarillo.

- Pigmentación.

La producción de pigmento de las distintas cepas, se observó en placas con agar tripton-soja (2.2.1.) incubadas a 30°C durante 72 horas.

El pigmento rosa se puso de manifiesto sembrando las cepas por estría en superficie en placas con el medio utilizado para ver la producción de fosfatasa e incubando a 30°C durante 3 días (165)

2. 4. 7. 2. 1. 2. Staphylococcus.

Las especies de éste género se identificaron según la clasificación de Kloos y Schleifer (118) Schleifer y Kloos (174) y Baird-Parker (12) realizándose las siguientes pruebas:

- Prueba de la coagulasa (103)

En un tubo de hemólisis se suspendieron 0,5 ml. de un cultivo de 24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2. 2. 5.) y luego se añadió 0,5 ml. de plasma coagulasa. La incubación se realizó a la temperatura de 37°C durante 3 a 18 horas. Se consideraron positivos los tubos que presentaron coagulación en este periodo de tiempo.

- Hemólisis en sangre bovina (119)

Se inocularon placas de agar sangre bovina (2. 2. 5.) con asa de cultivo por estría en superficie, a partir de un cultivo de 24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2. 2. 5.). Se incubó a la temperatura de 37°C durante 1 a 5 días, para observar los distintos tipos de hemólisis.

. Hemólisis beta: aparición de zona clara alrededor de la colonia.

. Hemólisis alfa: aparición de una zona verdosa alrededor de la colonia, después de la incubación a la temperatura de 37°C durante 24-48 horas, seguido de una incubación durante 18 horas a la temperatura del laboratorio.

- Sensibilidad a novobiocina.

Descrito en 2. 4. 7. 2. 1. 1.

- Prueba de la DNasa termoestable (123)

Se inoculó el medio del ADN (2. 2. 5.) con un cultivo de 24 horas en caldo infusión cerebro-corazón (2. 2. 5.), que previamente se había calentado durante 30 minutos en agua hirviendo. Con este cultivo calentado se impregnaron discos estériles, que se depositaron en la superficie de la placa con la ayuda de pinzas estériles. Se incu-

bó a 37°C y la observación de los resultados se hizo a 1, 2, 4 y 24 horas; considerándose positiva la prueba cuando se formó un halo rosa típico de 1-3 mm. alrededor del disco, que indicó la presencia de nucleasa termoestable.

- Fermentación de azúcares.

Se siguió la misma técnica empleada en la identificación de micrococos, para investigar la producción de ácido a partir de xilosa (2.4.7.2.1.1.).

Se realizó en los siguientes azúcares: fructosa, manosa, maltosa, lactosa, trehalosa, manitol, xilitol, xilosa y sacarosa, La concentración final de los diferentes azúcares en el medio base fue 1%.

- Presencia de ureasa.

Se hizo igual que la prueba descrita en (2.4.7.1.) para la identificación de Bacillus.

- Producción de acetoina.

Se hizo igual que la prueba descrita en (2.4.7.1.) para la identificación de Bacillus.

- Reducción de nitratos.

Se hizo igual que la prueba descrita en (2.4.7.1.) para la identificación de Bacillus.

- Producción de fosfatasa (119)

Se sembraron placas, con el medio P adicionado de difosfato de fenoltaleína (200 microgramos/ml.), por estría en superficie. Se incubó a 37°C durante 24 horas. La interpretación del resultado se hizo exponiendo las placas con crecimiento a vapores de amoníaco. Se consideró positivo en el caso de que las colonias se vuelvan rosas.

2.4.7.2.2. Streptococcus.

Para la identificación de las cepas de estreptococos se han seguido los criterios de la 8ª edición del Manual Bergey (37) y los mé-

todos de Buttiaux (46)

- Crecimiento a 10°C y 45°C.

Se sembró la cepa en un caldo glucosado (2.2.6.). Se incubó durante 48 horas a las temperaturas de 10°C y 45°C, y después se observó la presencia o ausencia de crecimiento.

- Crecimiento en leche de Sherman.

Se inoculó el medio de cultivo leche de Sherman (2.2.6.), con la cepa a estudiar y se incubó 24-48 horas a 37°C. Se consideró positivo el crecimiento cuando se decoloró el azul de metileno y hubo coagulación de la leche.

- Crecimiento en 40% de bilis.

Se inoculó la cepa a estudiar en agar sangre con 40% de bilis de buey (2.2.6.). Se incubó durante 48 horas a 37°C y después se observó la presencia o ausencia de crecimiento.

- Crecimiento en caldo con 6,5% de cloruro sódico.

Se inoculó la cepa a estudiar en caldo con 6,5% de cloruro sódico (2.2.6.). Se incubó durante 48 horas a 37°C y después se observó la presencia o ausencia de crecimiento.

- Resistencia al calor.

A partir de un cultivo de 24-36 horas en caldo glucosado se sembró por estría en superficie la mitad de una placa de agar sangre (2.2.6.). Después la suspensión del cultivo se calentó a 60°C durante 30 minutos, y se sembró la otra mitad de la placa, por estría en superficie. Se incubó durante 24 horas a 37°C y se observó la presencia o ausencia de crecimiento en la mitad de la placa que se había sembrado con cultivo calentado.

- Fermentación de los azúcares.

Se inoculó el medio de fermentación de azúcares, que contenían arabinosa o sorbitol, con pipeta Pasteur, a partir de un cultivo de

24 horas y después se recubrió con parafina estéril y se incubó a 37°C durante 4 días. Se consideró positiva la fermentación cuando apareció un viraje del indicador a color amarillo.

- Hidrólisis de la esculina.

Se inoculó la cepa, con asa de cultivo por estría en superficie, y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se consideró positiva la prueba cuando por desdoblamiento de la esculina, en glucosa y esculetina apareció coloración pardo oscuro, debido a la reacción del hierro con la esculetina.

- Hidrólisis del hipurato

A partir de un cultivo de 24 horas, se inoculó el caldo hipurato y se incubó durante 4 días a 37°C. Se consideró positiva la hidrólisis del hipurato a benzoato, cuando al añadir a 1 ml. de cultivo, la cantidad de 0,2 ml. a 0,5 ml. de solución de cloruro férrico, agitando rápidamente aparece un precipitado denso, que no se redissuelve.

2.4.7.3. Hongos.

Se ha seguido la clasificación de Barnett (16) Ajello (2) y "Committee on continuing education American Society for Microbiology"(52).

Durante el aislamiento ya se han obtenido algunas ideas sobre su morfología en el medio OGA. Pero es imprescindible hacer una descripción exacta y completa del hongo, ya que para su identificación sólo se emplearán caracteres morfológicos, según las siguientes técnicas (3) (179) :

- Observación macroscópica por cultivo en placa.

Las colonias aisladas se inocularon, con asa micológica, en una placa de agar Czapek-Dox (2.2.2.) e incubaron a la temperatura de 25°C durante 5 días. Los cultivos se examinaron diariamente anotando las siguientes características:

. Grado de crecimiento determinando el diámetro real de la co-

lonia.

- . Color de la colonia y cambios de color producidos en el medio.
- . Aspecto, textura superficial y olor.

- Observación microscópica por cultivo en placas.

-- Examen de cultivos vivos en seco:

Las placas Petri se colocaron horizontalmente en posición normal observando las colonias con lupa. Se anotaron la forma, color y tamaño de las cabezas esporóforas, el origen de los conidióforos y la disposición de las cadenas de esporas, ya que tienen un valor diagnóstico considerable.

-- Examen de preparaciones en portaobjetos:

De la placa con medio agar Czapek-Dox (2.2.2.) donde se había desarrollado bien la colonia, se tomó un fragmento con el asa micológica y se depositó en un portaobjetos en el centro del cual se depositó una gota de azul de lactofenol (53) (2.3.). Se calentó cuidadosamente y se colocó encima el cubreobjetos.

La observación se hizo en un microscopio con objetivo seco de 40x. Se anotaron las características de: las hifas (color, presencia de septos), de los esporangios (color, tamaño, forma) y de las esporas (color, tamaño, forma y disposición).

-- Microcultivo: se realizó según el método original de Rivallier y Seydel de 1932 modificado (129).

Se preparó una placa conteniendo una lámina de papel de filtro y un tubo acodado, donde se apoya un portaobjetos, y un cubreobjetos, esterilizando todo el conjunto por calor seco.

Como medio de cultivo se utilizó indistintamente agar Czapek-Dox (2.2.2.) y agar Sabouraud (2.2.2.) poniendo una lámina muy fina, en una placa estéril, se tomó con el asa micológica un cuadrado de 1 cm², y se depositó en el portaobjetos, después se sembró el moho a estudiar y encima se colocó el cubreobjetos. Para mantener

una atmósfera con humedad suficiente se añadió un poco de agua destilada estéril sobre el papel de filtro. Se incubó a la temperatura de 25°C durante 2 a 5 días.

La observación del microcultivo se hizo trasladando el cubreobjetos a un portaobjetos limpio y poniendo una gota de azul de lactofenol (2. 3.). Se utilizó un objetivo seco de 40x.

Esta técnica tiene la ventaja de poder observar con claridad la iniciación del crecimiento del moho, formación de hifas e implantación de las esporas, que suelen ser una característica de cada género.

III RESULTADOS

3.1. - CONTAMINACION MICROBIANA DE LOS MEDICAMENTOS.

Los datos experimentales se han obtenido del estudio de la contaminación microbiana de 108 medicamentos que corresponden a especialidades farmacéuticas, no estériles de administración oral, procedentes de diferentes laboratorios nacionales y multinacionales, que han sido comercializados en España. Las formas farmacéuticas a las que corresponden son:

- 33 comprimidos del número 1 al 33
- 14 grageas del número 34 al 47
- 23 cápsulas del número 48 al 70
- 13 jarabes del número 71 al 83
- 15 soluciones del número 84 al 97 y 108
- 9 polvos y granulado del número 98 al 106
- 1 extracto fluído el número 107.

Los resultados de la contaminación microbiana de cada una de las muestras de los medicamentos se expresan en la tabla III-1.

En los medicamentos del 1 al 70 y 98 al 107, que corresponden a las formas sólidas, se realizó:

- Recuento de bacterias aerobias viables y esporuladas mesófilas por los métodos de placa y NMP.
- Recuento de bacterias anaerobias viables y esporuladas mesófilas, por el método de placa.
- Recuento de mohos y levaduras, por el método de placa.

En los medicamentos del 71 al 97 y 108, que corresponden a las formas líquidas, se realizó:

- Recuento de bacterias aerobias viables y esporuladas mesófilas, por los métodos de placa, NMP y filtración.
- Recuento de bacterias anaerobias viables y esporuladas mesófilas, por los métodos de placa y filtración.

- Recuento de mohos y levaduras, por los métodos de placa y filtración.

El medicamento 108 no se realizó por el método de filtración, debido a que el volumen era reducido.

Se ha expresado la ausencia de contaminación microbiana, en el caso del método de recuento en placa como menor de 10, ya que indica que hay un número de bacterias inferior a la menor dilución sembrada, y por el método del NMP se expresa como menor de 3, que indica que hay un número de bacterias inferior al número de tubos sembrados por serie; siguiendo los criterios de A. P. H. A. (4)

- En bacterias aerobias viables las cifras de contaminación fueron de 15 a 31.258 por el método de placa y de 4 a 24.000 por el método del NMP.

± Para bacterias aerobias esporuladas estos valores han sido de 15 a 32.586 por el método de placa y de 4 a 11.000 por el método del NMP.

- En bacterias anaerobias viables las cifras de contaminación microbiana fueron de 15 a 850.

- Para bacterias anaerobias esporuladas de 15 a 670, por el método de placa.

Los valores obtenidos en anaerobios han sido los más bajos de todos los recuentos de microorganismos.

-El número de mohos y levaduras ha variado de 15 a 1.950, con excepción de dos muestras de comprimidos, 21_A y 21_B, que han presentado valores más elevados: 52.720 y 90.340 respectivamente.

Como comentario general hay que indicar que no se han obtenido valores muy altos de contaminación microbiana, salvo en algunas muestras. Así tenemos que el 50,82 % de éstas tenían ausencia de conta-

minación por bacterias y con cifras inferiores a 100 bacterias por gramo o mililitro el 26,23%. En cuanto a la contaminación fúngica presentaban ausencia el 88,88% y el 6,15% tenían valores inferiores a 100 hongos por gramo o mililitro.

También se ha realizado en todas las muestras de medicamentos la investigación de la presencia de bacterias patógenas e indicadoras de contaminación fecal como: Salmonella, Shigella, S. aureus, Ps. aeruginosa, E. coli y S. faecalis. A pesar de haber realizado cultivos de enriquecimiento, en los medios adecuados, para la detección de estos microorganismos, todas las muestras han presentado ausencia de estas bacterias.

Tabla III-1- Contaminación microbiana de los medicamentos, pH, tipo de envase y grupo terapéutico.

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
1	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	3	S.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
2	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	3	S.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
3	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	2, 5	P.	D.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
4	A	<10	<3	<10	4	<10	<10	40	7	S.	A.
	B	50	<3	23	<3	<10	<10	85			
	C	52	<3	40	<3	<10	<10	<10			
5	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	4	S.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
6	A	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	68	7	S.	A.
	B	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	75			
	C	35	240	< 10	25	< 10	< 10	52			
7	A	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	< 10	3	B.	A.
	B	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	< 10			
	C	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	< 10			
8	A	< 10	300	< 10	25	< 10	< 10	< 10	3	B.	A.
	B	< 10	43	< 10	25	< 10	< 10	< 10			
	C	< 10	28	< 10	25	< 10	< 10	< 10			
9	A	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	< 10	5	S.	T.
	B	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	< 10			
	C	< 10	< 3	< 10	< 3	< 10	< 10	< 10			
10	A	45	1,100	< 10	75	15	< 10	15	7, 5	S.	A. Ac.
	B	25	150	15	25	< 10	< 10	70			
	C	15	150	25	150	20	< 10	< 10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
11	A	15	93	15	43	<10	<10	<10	6,5	P.	T.
	B	22	93	<10	43	<10	<10	<10			
	C	35	460	21	93	<10	<10	<10			
12	A	40	240	20	240	45	60	<10	8	P.	A.Ac
	B	15	150	<10	240	<10	<10	<10			
	C	20	460	<10	93	20	<10	<10			
13	A	50	240	35	240	27	35	<10	6,5	B.	A.Di.
	B	60	460	30	240	25	15	<10			
	C	<10	28	30	28	<10	<10	<10			
14	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	3	B.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
15	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	3	B.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
16	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6	P.	Vi.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	4	<10	<3	<10	<10	<10			
17	A	250	1100	50	<3	<10	<10	15	6,5	P.	A. Es.
	B	<10	28	<10	28	<10	<10	<10			
	C	<10	9	85	<3	<10	<10	<10			
18	A	<10	<3	103	<3	30	<10	<10	3	T. al.	Vi.
	B	370	4	183	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	28	30	<3	<10	<10	<10			
19	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	8	S.	A. Ac.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
20	A	<10	28	<10	28	<10	<10	<10	6,5	V.	H.
	B	<10	240	<10	28	<10	<10	<10			
	C	<10	460	15	28	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
21	A	31258	93	32586	43	<10	<10	52,720	7	V.	Di.
	B	15851	460	16280	150	<10	<10	90,340			
	C	65	75	150	3	<10	<10	<10			
22	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	V.	A. Es
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
23	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	S.	A. U.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
24	A	975	2400	157	2400	30	10	72	5	B.	A. Es
	B	1117	2400	30	460	30	25	215			
	C	850	2400	132	240	80	62	10			
25	A	<10	460	<10	93	<10	<10	<10	7	S.	A.
	B	<10	93	40	150	<10	<10	<10			
	C	50	240	25	23	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
26	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	S.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	9	<10	23	<10	<10	<10			
27	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6,5	S.	C. R.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
28	A	<10	23	<10	23	<10	<10	<10	6	V.	A. Es.
	B	<10	23	<10	23	<10	<10	<10			
	C	<10	23	<10	23	<10	<10	<10			
29	A	<10	93	<10	23	<10	<10	<10	7	S.	A.
	B	<10	43	<10	43	<10	<10	<10			
	C	<10	43	<10	23	<10	<10	<10			
30	A	<10	4	<10	4	<10	<10	<10	7	B.	H.
	B	<10	9	<10	9	<10	<10	<10			
	C	<10	9	<10	4	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO		NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
31	A	35	2400	265	460	<10	80	<10	3	V.	Vi.
	B	35	2400	15	1100	25	82	<10			
	C	165	2400	262	2400	<10	160	<10			
32	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6,5	S.	A.A.s
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
33	A	20	43	30	460	<10	<10	<10	7,5	S.	A.A.c
	B	20	43	<10	43	<10	<10	<10			
	C	120	93	20	43	<10	<10	<10			
34	A	<10	23	<10	23	<10	<10	<10	6,5	B.	Ah.
	B	<10	23	<10	23	<10	<10	<10			
	C	<10	23	<10	23	<10	<10	<10			
35	A	490	460	570	4600	25	45	<10	6,5	B.	H.
	B	330	1100	1177	2400	55	67	<10			
	C	1040	1100	1576	1100	30	67	15			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO		NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
36	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	5	V.	Vi.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
37	A	<10	9	<10	9	<10	<10	<10	7,5	P.	At.
	B	<10	23	<10	9	<10	<10	<10			
	C	<10	23	<10	4	<10	<10	<10			
38	A	<10	23	<10	<3	<10	<10	<10	6,5	B.	H.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
39	A	35	1100	35	93	<10	<10	<10	7	B.	H.
	B	215	1500	102	240	<10	<10	<10			
	C	361	460	225	460	<10	<10	<10			
40	A	<10	23	<10	23	<10	<10	<10	7	V.	Es.
	B	<10	43	<10	23	<10	<10	<10			
	C	45	460	<10	23	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
41	A	67	2100	45	210	20	15	<10	6	V.	A. Es.
	B	150	1100	75	93	45	35	<10			
	C	55	460	30	15	<10	15	<10			
42	A	<10	9	<10	<3	<10	<10	<10	7	V.	T.
	B	<10	23	<10	9	<10	<10	<10			
	C	<10	9	<10	<3	<10	<10	<10			
43	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6,5	V.	Vd.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
44	A	4540	11000	4250	11000	90	60	<10	6,5	B.	H.
	B	5845	11000	3550	11000	32	20	<10			
	C	2207	11000	1026	11000	40	35	<10			
45	A	1570	11000	1370	11000	200	72	<10	7	B.	H.
	B	941	4600	1501	4600	240	240	<10			
	C	651	2400	1305	11000	147	140	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
46	A	15	150	<10	43	<10	<10	<10	6,5	B.	H.
	B	20	240	<10	23	<10	<10	<10			
	C	<10	43	20	23	<10	<10	<10			
47	A	75	43	20	43	<10	<10	<10	7	V.	Col.
	B	77	43	30	43	<10	<10	<10			
	C	35	23	25	23	<10	<10	<10			
48	A	611	1100	340	460	35	<10	<10	5,5	V.	Vi.
	B	648	1100	552	460	150	15	<10			
	C	397	460	305	240	35	15	<10			
49	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6	B.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
50	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	25	6,5	P.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	80			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	70			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
51	A	<10	< 3	<10	< 3	<10	< 10	<10	5,5	V.	A.
	B	<10	< 3	<10	< 3	<10	< 10	<10			
	C	<10	< 3	<10	< 3	<10	< 10	<10			
52	A	<10	240	<10	93	<10	<10	<10	6	V.	VP.
	B	<10	43	<10	23	<10	<10	<10			
	C	<10	93	<10	43	<10	<10	<10			
53	A	<10	<3	<10	< 3	<10	<10	<10	7	V.	T.
	B	<10	<3	<10	< 3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	< 3	<10	<10	<10			
54	A	1250	11000	807	2100	20	<10	<10	6	V.	Di.
	B	968	24000	1066	11000	15	<10	<10			
	C	5260	24000	2325	11000	<10	15	<10			
55	A	<10	93	<10	43	<10	<10	<10	9	V.	A. Es
	B	<10	43	<10	23	<10	<10	<10			
	C	<10	64	<10	43	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
56	A	<10	240	<10	23	<10	<10	<10	8	V.	A. Es.
	B	<10	93	<10	23	<10	<10	20			
	C	<10	43	<10	23	<10	<10	<10			
57	A	<10	93	<10	460	<10	<10	<10	5,5	P.	A. R.
	B	<10	43	<10	93	<10	<10	<10			
	C	<10	23	<10	93	<10	<10	<10			
58	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6	V.	A. R.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
59	A	650	1100	350	150	70	55	<10	6	V.	T.
	B	685	240	370	93	70	20	<10			
	C	430	460	300	93	50	35	<10			
60	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6,5	V.	A. P.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
61	A	<10	23	<10	9	<10	<10	22	6	V.	Cl.
	B	<10	9	<10	4	<10	<10	115			
	C	<10	23	<10	<3	<10	<10	40			
62	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	V.	Ps.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
63	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6	V.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
64	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	5,5	V.	T.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
65	A	<10	23	<10	9	<10	<10	<10	6	B.	Vd.
	B	<10	9	<10	9	<10	<10	<10			
	C	<10	23	<10	9	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO		NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
66	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	6,5	V.	A. R.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
67	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	V.	A.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
68	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	V.	A.De
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
69	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	P.	Ps.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
70	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	5	V.	Vi.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			

Tabla III-1 - (continuación)

MEDICAMENTO			NUMERO DE MICROORGANISMOS / n.l.																									
MUESTRA																												
77	A	< 10	Aerobios viables (método placa)	< 3	Aerobios viables (método NMP)	< 10	Aerobios viables (método filtración)	< 10	Aerobios esporulados (método placa)	< 3	Aerobios esporulados (método NMP)	< 10	Aerobios esporulados (método filtración)	< 10	Anaerobios viables (método placa)	< 10	Anaerobios viables (método filtración)	< 10	Anaerobios esporulados (método placa)	< 10	Anaerobios esporulados (método filtración)	< 10	Mohos y Levaduras (método placa)	< 10	Mohos y Levaduras (método filtración)			
	B	< 10		< 3		< 10		< 10		< 3		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		6,5	V.	At.
	C	< 10		< 3		< 10		< 10		< 3		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10				
78	A	225		1100		25		125		460		20		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10				
	B	160		460		20		65		240		19		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		7	V.	At.
	C	165		460		26		105		460		22		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10				
79	A	20		210		15		15		93		13		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10				
	B	< 10		240		16		< 10		93		17		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		7	V.	At.
	C	< 10		15		18		< 10		43		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10		< 10				

Tabla III-1 - (continuación)

MEDICAMENTO			MUESTRA			NUMERO DE MICROORGANISMOS / ml.		
A	B	C	A	B	C			
25	<10	<10	<10	<10	<10	Aerobios viables (método placa)		
4	20	4	4	43	43	Aerobios viables (método NMP)		
<10	<10	<10	14	13	15	Aerobios viables (método filtración)		
<10	<10	<10	<10	<10	<10	Aerobios esporulados (método placa)		
9	<3	4	9	<3	9	Aerobios esporulados (método NMP)		
<10	<10	<10	11	<10	9	Aerobios esporulados (método filtración)		
<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios viables (método placa)		
<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios viables (método filtración)		
<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios esporulados (método placa)		
<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios esporulados (método filtración)		
<10	<10	<10	<10	<10	<10	Mohos y Levaduras (método placa)		
<10	15	<10	<10	<10	<10	Mohos y Levaduras (método filtración)		
	6			7		pH		
V.	V.		V.	V.		Tipo de envase		
At.	At.		At.	At.		Grupo terapéutico		

Tabla III-1 - (continuación)

88			87			86			MEDICAMENTO	NUMERO DE MICROORGANISMOS / ml.
C	B	A	C	B	A	C	B	A	MUESTRA	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Aerobios viables (método placa)	
<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	Aerobios viables (método NMP)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Aerobios viables (método filtración)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Aerobios esporulados (método placa)	
<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	Aerobios esporulados (método NMP)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Aerobios esporulados (método filtración)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios viables (método placa)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios viables (método filtración)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios esporulados (método placa)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Anaerobios esporulados (método filtración)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Mohos y Levaduras (método placa)	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Mohos y Levaduras (método filtración)	
5			3, 5			8			pH	
V.			V.			V.			Tipo de envase	
At.			VI.			DI.			Grupo terapéutico	

Tabla III-1 - (continuación)

MEDICAMENTO			NUMERO DE MICROORGANISMOS / ml.																									
MUESTRA																												
95	A	<10	Aerobios viables (método placa)	<3	Aerobios viables (método NMP)	<10	Aerobios viables (método filtración)	<10	Aerobios esporulados (método placa)	<3	Aerobios esporulados (método NMP)	<10	Aerobios esporulados (método filtración)	<10	Anaerobios viables (método placa)	<10	Anaerobios viables (método filtración)	<10	Anaerobios esporulados (método placa)	<10	Anaerobios esporulados (método filtración)	<10	Mohos y Levaduras (método placa)	<10	Mohos y Levaduras (método filtración)			
	B	<10		<3		<10		<10		<3		<10		<10		<10		<10		<10		<10		<10		6	V.	Di.
	C	<10		<3		<10		<10		<3		<10		<10		<10		<10		<10		<10		<10				
96	A	<10	Aerobios viables (método placa)	<3	Aerobios viables (método NMP)	<10	Aerobios viables (método filtración)	<10	Aerobios esporulados (método placa)	<3	Aerobios esporulados (método NMP)	<10	Aerobios esporulados (método filtración)	<10	Anaerobios viables (método placa)	<10	Anaerobios viables (método filtración)	<10	Anaerobios esporulados (método placa)	<10	Anaerobios esporulados (método filtración)	50	Mohos y Levaduras (método placa)	<10	Mohos y Levaduras (método filtración)			
	B	<10		<3		<10		<10		<3		<10		<10		<10		<10		<10		15	Mohos y Levaduras (método placa)	<10	Mohos y Levaduras (método filtración)	5,5	V.	A.Es.
	C	<10		<3		<10		<10		<3		<10		<10		<10		<10		<10		<10		<10				
97	A	<10	Aerobios viables (método placa)	<3	Aerobios viables (método NMP)	<10	Aerobios viables (método filtración)	<10	Aerobios esporulados (método placa)	<3	Aerobios esporulados (método NMP)	<10	Aerobios esporulados (método filtración)	<10	Anaerobios viables (método placa)	<10	Anaerobios viables (método filtración)	<10	Anaerobios esporulados (método placa)	<10	Anaerobios esporulados (método filtración)	<10	Mohos y Levaduras (método placa)	<10	Mohos y Levaduras (método filtración)			
	B	<10		<3		<10		<10		<3		<10		<10		<10		<10		<10		<10		<10		2,5	V.	A.De.
	C	<10		<3		<10		<10		<3		<10		<10		<10		<10		<10		<10		<10				

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
98	A	20	23	<10	9	<10	<10	<10	7	S. p. p	A. Ac
	B	15	23	<10	4	<10	<10	<10			
	C	<10	9	<10	<3	<10	<10	<10			
99	A	15	93	<10	43	<10	<10	<10	7,5	S. p. p	A. Ac
	B	<10	<3	<10	9	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
100	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7,5	S. p. p	A. Ac
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	10			
	C	<10	<3	<10	4	<10	<10	10			
101	A	<10	93	15	75	<10	<10	<10	4,5	S. al	A.
	B	35	93	15	43	<10	<10	<10			
	C	<10	93	20	43	<10	<10	<10			
102	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	5,5	E. C.	Vi.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
103	A	72	460	42	1,100	80	50	<10	7,5	S.al.	A.Ac.
	B	92	43	30	21	45	20	<10			
	C	162	460	77	23	30	25	<10			
104	A	5600	24000	3170	24000	<10	<10	50	8	P.	A.Ac.
	B	2055	11000	2098	11000	<10	<10	825			
	C	3421	11000	2858	9300	100	30	753			
105	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	7	V.	CR.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
106	A	<10	15	<10	<3	<10	<10	<10	4,2	S.al.	Vi.
	B	<10	20	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	15	<10	15	250	<10	<10			
107	A	6033	2400	4552	2400	400	290	500	4,5	V.	Lax.
	B	8146	2400	6750	2400	840	670	570			
	C	8100	2400	6833	2400	850	615	1050			

Tabla III-1- (continuación)

MEDICAMENTO	MUESTRA	NUMERO DE MICROORGANISMOS / g							pH	Tipo de envase	Grupo terapéutico
		Aerobios viables (método placa)	Aerobios viables (método NMP)	Aerobios esporulados (método placa)	Aerobios esporulados (método NMP)	Anaerobios viables (método placa)	Anaerobios esporulados (método placa)	Mohos y Levaduras (método placa)			
108	A	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10	3	V.	Vi.
	B	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			
	C	<10	<3	<10	<3	<10	<10	<10			

Abreviaturas. -

A: Analgésico no narcótico y antipirético; D: Digestivos, incluidas enzimas; T: Tranquilizante; A.Ac: Antiácidos solos o con antiespasmódicos u otras sustancias; A.Di: Antidiabético; Vi: Vitaminas con o sin minerales, estimulantes del apetito, tónicos y complementos de la alimentación; A.Es: Antiespasmódicos y anticolinérgicos; H: Preparados hormonales; Di: Diuréticos y combinaciones de Rauwolfia; A.U.: Antiúlceras péptica; C.R.:Contraste radiológico; A.As: Antiasmáticos; Ah: Antihistamínicos; At: Antitusígenos y expectorantes excluyendo balsámicos con o sin combinaciones, excluyendo antiinfecciosos; Vd.: Vasodilatador periférico; Vp: Vasoprotector; Col: Terapia biliar; A.R.: Antirreumático; A.P.:Antiparkinsoniano; Ci: Citostáticos; A.De: Antidepresores, timoanalépticos; Ps.: Psicolépticos y psicoanalépticos; A.Em: Antiemético; Es.: Estomatológico; Lax: Laxante.

V: Envase de vidrio; B: Estuche "blister"; P: Envase de plástico; S.p.p.:Sobres de papel parafinado; S.al: Sobres recubiertos de aluminio; E.C.:Envase de cartón; T.al: Tubo de aluminio.

3.2. RELACION DEL GRUPO TERAPEUTICO CON LA CONTAMINACION MICROBIANA.

Los medicamentos estudiados han pertenecido a 24 grupos terapéuticos distintos, los cuales se han denominado siguiendo los criterios del Catálogo de Especialidades Farmacéuticas (48). En la tabla III-1 se detalla el grupo terapéutico a que pertenecen cada medicamento.

Para hacer una relación entre la presencia de la contaminación microbiana y el grupo terapéutico, se han tenido en consideración sólo 11 grupos terapéuticos, que incluyen al 91,63% de los preparados farmacéuticos. Los 14 grupos restantes no se han tenido en cuenta porque la mayoría sólo incluían 1 ó 2 medicamentos y se han considerado cifras no representativas.

En la tabla III-2 se expresa el porcentaje de contaminación microbiana de cada uno de los 11 grupos terapéuticos. Los preparados hormonales han tenido presencia de contaminación microbiana en el 100% de estos medicamentos, los antiespasmódicos en el 87,50% y los antiácidos en el 80%, el grupo de contraste radiológico ha presentado ausencia de contaminación microbiana en el 100% de los preparados

Tabla III-2. Relación del grupo terapéutico con la contaminación microbiana.

Grupo terapéutico	Número de medicamentos	Presencia de contaminación	
		nº	%
Analgésicos	18	8	44,44
Vitaminas	13	6	46,15
Antitusígenos	12	6	50
Antiácidos	10	8	80
Hormonas	9	9	100
Antiespasmódicos	8	7	87,50
Tranquilizantes	7	4	57,15
Digestivos	4	1	25
Antirreumáticos	3	1	33,33
Contraste radiológico	3	-	-
Antiasmáticos	3	1	33,33

3.3. RELACION DEL PH Y LA CONTAMINACION MICROBIANA.

Los preparados farmacéuticos han presentado unos valores de pH comprendidos entre 2 y 9. En la tabla III-1 se detalla el pH que corresponde a cada medicamento. Para establecer una relación entre el pH y la contaminación bacteriana y fúngica, se han agrupado los valores de pH en cuatro intervalos: menor de 5, 5 a 6'4, 6'5 a 7'5 y mayor de 7'5.

El 42, 59% de las muestras tenían un valor de pH de 6'5 a 7'5 y un 5, 55% mayor de 7'5. El porcentaje mayor de muestras que presentaban contaminación bacteriana se encontró en la zona de pH mayor de 7'5 (66, 66 %) y el más bajo a pH menor de 5 (40%). También el mayor % de muestras de contaminación fúngica se ha presentado a pH mayor de 7'5 (22, 22%) (tabla III-3)

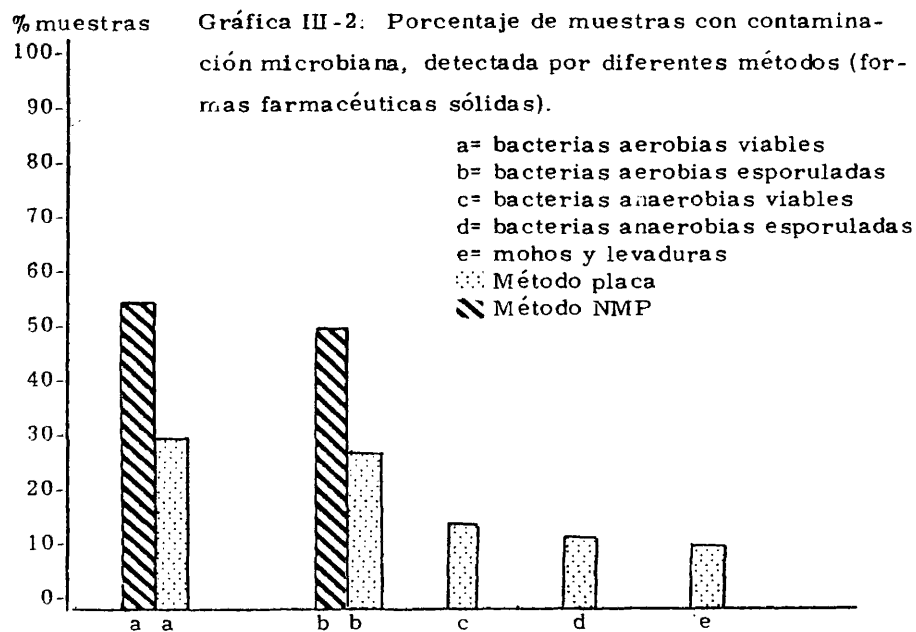
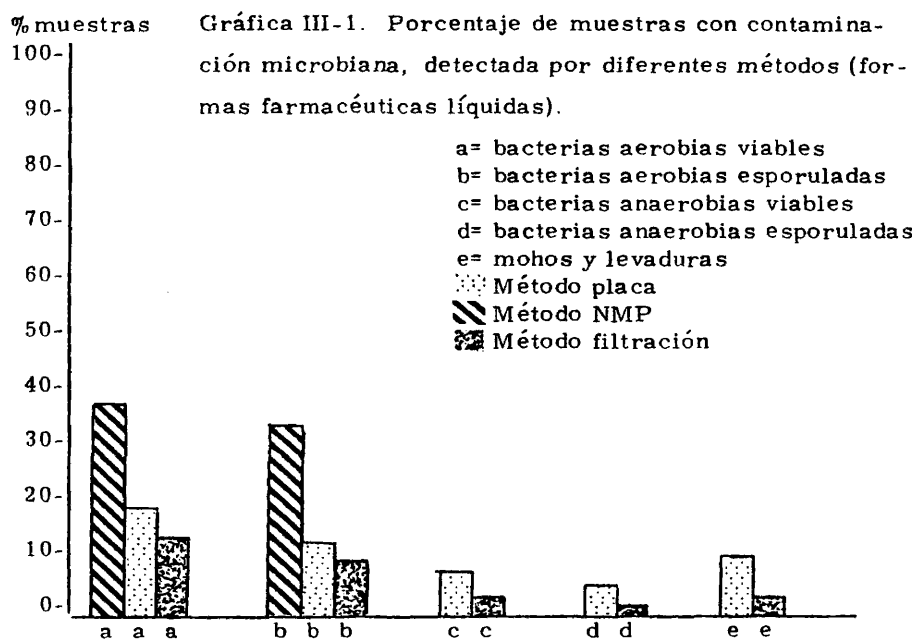
Tabla III-3. Relación del pH y la contaminación microbiana.

pH	< 5		5 - 6,4		6,5 - 7,5		> 7,5	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Muestras								
Presencia de bacterias aerobias	24	40	46	42,60	86	62,32	12	66,66
Presencia de mohos y levaduras	6	10	11	10,18	13	9,42	4	22,22
Total de muestras	60	18,51	108	33,33	138	42,59	18	5,55

3.4. RELACION DE LOS METODOS DE RECUESTO CON LA DETECCION DE LA CONTAMINACION MICROBIANA.

Como se observa en la gráfica III-1, en los preparados líquidos, la mayor proporción de muestras contaminadas, se ha detectado por el método del NMP 35, 80% para bacterias aerobias viables y 33, 33% para bacterias aerobias esporuladas, frente al método de placa con el 18, 51% y 11, 11% respectivamente. El método de filtración ha sido el que menos porcentaje de muestras positivas ha detectado 12, 34% y 9, 87% respectivamente.

En la gráfica III-2 se expresa el porcentaje de muestras de los preparados sólidos, con contaminación microbiana. La mayor proporción de muestras contaminadas se ha detectado por el método del NMP 54, 16% para bacterias aerobias viables y 50% para esporuladas, frente al método de placa con el 30% y el 28, 75% respectivamente.



3.5. GRADO DE CONTAMINACION MICROBIANA DE LAS FORMAS FARMACEUTICAS

Dentro de cada forma farmacéutica se han agrupado los valores de contaminación microbiana de las muestras de medicamentos, según distintas categorías microbiológicas, siguiendo criterios semejantes a otros investigadores Azria (8), Desvignes (60) y Dony y Gerard (66).

- Ausencia de contaminación microbiana.
- Menos de 100 microorganismos por g o ml.
- De 100 a 1.000 microorganismos por g o ml.
- Más de 1.000 microorganismos por g o ml.

3.5.1. BACTERIAS AEROBIAS.

- Bacterias aerobias viables, método de placa (tabla III-4).

Las soluciones y las cápsulas fueron las formas farmacéuticas que presentaron mayor porcentaje de muestras con ausencia de estas bacterias, el 93,33% y 86,95% respectivamente. Las grageas, polvos y granulado son las que presentaban mayor grado de contaminación microbiana, ya que el 11,90% y 11,11% respectivamente de las muestras tenían más de 1.000 bacterias por gramo.

- Bacterias aerobias viables, método del NMP (tabla III-5)

Por este método también las soluciones y las cápsulas fueron las formas farmacéuticas que tenían mayor porcentaje de muestras con ausencia de estas bacterias, el 86,66% y 60,86% respectivamente. Así mismo las grageas, polvos y granulado presentaron mayor % de muestras con más de 1.000 bacterias por gramo, el 28,57% y 11,11% respectivamente.

- Bacterias aerobias viables, método de filtración (tabla III-6)

Las soluciones presentaron ausencia en el 100% de las muestras y los jarabes tenían valores menores de 100 por mililitro en el 25,65% de las muestras.

- Bacterias aerobias esporuladas, método placa (tabla III-7).

Las soluciones y las cápsulas fueron las que presentaron mayor proporción de muestras con ausencia de estas bacterias, 97,77% y 86,95% respectivamente. Las grageas han presentado valores mayores de 1.000 por gramo, en el 19,04% de las muestras y los polvos y granulado en el 11,11%.

- Bacterias aerobias esporuladas, método NMP (tabla III-8).

También por este método fueron las soluciones y las cápsulas las formas farmacéuticas con mayor porcentaje de ausencia, 86,66% y 62,31% respectivamente. Las grageas, polvos y granulado han sido las que tenían mayor porcentaje de muestras con valores mayores de 1.000 por gramo, 21,42% y 14,81% de las muestras respectivamente.

- Bacterias aerobias esporuladas, método de filtración (tabla III-9).

Las soluciones presentaron ausencia en el 100% de las muestras y los jarabes han tenido valores menores de 100 por mililitro en el 20,52% de las muestras.

3.5.2. BACTERIAS ANAEROBIAS.

- Bacterias anaerobias viables, método de placa (tabla III-10).

Los preparados líquidos han sido los que tenían mayor porcentaje de muestras con ausencia, 93,33% las soluciones y 92,30% los jarabes. Las grageas, polvos y granulado han presentado valores entre 100-1.000 en el 7,14% y 3,70% de las muestras respectivamente.

- Bacterias anaerobias viables, método de filtración (tabla III-11).

Las soluciones han tenido ausencia en el 100% de las muestras y los jarabes sólo el 2,56% de las muestras han presentado contaminación, pero con valores menores de 100 por mililitro

- Bacterias anaerobias esporuladas, método de placa (tabla III-12).

Los preparados líquidos han sido los que tenían mayor proporción de muestras con ausencia, el 97,77% en soluciones y el 94,87% en jarabes. Las grageas y comprimidos han tenido valores entre 100-1000 por gramo en el 4,76% y 1,01% de las muestras respectivamente.

- Bacterias anaerobias esporuladas, método de filtración (tabla III-13).

Las soluciones y los jarabes han tenido ausencia en el 100% de las muestras.

3.5.3. MOHOS Y LEVADURAS.

- Mohos y levaduras, método de placa (tabla III-14).

Las grageas y las soluciones han sido las formas farmacéuticas que han presentado mayor porcentaje de muestras con ausencia el 97,61% y 95,55% respectivamente. Los comprimidos han sido los preparados que han tenido valores mayores de 1000 por gramo en el 2,02% de las muestras.

- Mohos y levaduras, método de filtración (tabla III-15).

Las soluciones han presentado ausencia de este tipo de contaminación en el 100% de las muestras y los jarabes han tenido valores menores de 100 por mililitro en el 2,56% de las muestras.

3.5.4. PRESENCIA DE CONTAMINACION MICROBIANA EN LAS FORMAS FARMACEUTICAS SOLIDAS Y LIQUIDAS.

En la gráfica III-3 se refleja el porcentaje de muestras con presencia de contaminación microbiana en las formas farmacéuticas sólidas: comprimidos, grageas, cápsulas, polvos y granulado. La mayor proporción de muestras con contaminación bacteriana se ha presentado en grageas y la menor en cápsulas. En cuanto a la contaminación

fúngica fue la más elevada en comprimidos y polvos. El menor porcentaje se presentó en grageas.

En la gráfica III-4 se refleja el porcentaje de muestras con presencia de contaminación microbiana en las formas farmacéuticas líquidas: jarabes y soluciones. La mayor proporción de muestras con contaminación bacteriana y fúngica se ha presentado en jarabes y la menor en las soluciones.

Tabla III-4- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias aerobias viables (método de placa).

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%				
COMPRESIDOS	99	70	70,70	20	20,20	6	6,06	3	3,03				
GRAGEAS	42	21	50	9	21,42	7	16,66	5	11,90				
CAPSULAS	69	60	86,95	-	-	7	10,14	2	2,89				
JARABES	39	27	69,23	6	15,38	5	12,51	1	2,56				
SOLUCIONES	45	42	93,33	2	4,44	1	2,22	-	-				
POLVOS Y GRANULADO	27	17	62,96	6	22,22	1	3,70	3	11,11				
EXTRACTO FLUIDO	3	-	-	-	-	-	-	3	100				
TOTAL DE MUESTRAS	324	237	73,14	43	13,27	27	8,33	17	5,24				

Tabla III-5- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias aerobias viables (método del NMP)

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%				
COMPRIMIDOS	99	49	49,49	27	27,27	15	15,15	8	8,08				
GRAGEAS	42	8	19,04	16	38,09	6	14,28	12	28,57				
CAPSULAS	69	42	60,86	16	23,18	5	7,24	6	8,69				
JARABES	39	16	41,02	12	30,76	9	23,07	2	5,12				
SOLUCIONES	45	39	86,66	3	6,66	2	4,44	1	2,22				
POLVOS Y GRANULADO	27	11	40,74	11	40,74	2	7,40	3	11,11				
EXTRACTO FLUIDO	3	-	-	-	-	-	-	3	100				
TOTAL DE MUESTRAS	324	165	50,92	85	26,23	39	12,03	35	10,80				

Tabla III-6- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias aerobias viables.
(método de filtración).

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA								
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000		
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
JARABES	39	31	79,48	10	25,65	-	-	-	-	
SOLUCIONES	42	42	100	-	-	-	-	-	-	
TOTAL DE MUESTRAS	81	73	90,12	10	12,34	-	-	-	-	

Tabla III-7 - Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias aerobias esporuladas (método de placa).

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%				
COMPRESIDOS	99	70	70,70	20	20,20	7	7,07	2	2,02				
GRAGEAS	42	23	54,76	8	19,04	3	7,14	8	19,04				
CAPSULAS	69	60	86,95	-	-	7	10,14	2	2,89				
JARABES	39	31	79,48	5	12,82	2	5,12	1	2,56				
SOLUCIONES	45	44	97,77	-	-	1	2,22	-	-				
POLVOS Y GRANULADO	27	18	66,66	6	22,22	-	-	3	11,11				
EXTRACTO FLUIDO	3	-	-	-	-	-	-	3	100				
TOTAL DE MUESTRAS	324	246	75,92	39	12,03	20	6,17	19	5,86				

Tabla III-8- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias aerobias esporuladas.
(método del NMP)

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLOGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%				
COMPRESIDOS	99	54	54,54	32	32,32	11	11,11	2	2,02				
GRAGEAS	42	11	26,19	19	43,23	3	7,14	9	21,42				
CAPSULAS	69	43	62,31	18	26,08	5	7,24	3	4,34				
JARABES	39	18	46,15	16	41,02	5	12,88	-	-				
SOLUCIONES	45	39	86,66	4	8,88	1	2,22	1	2,22				
POLVOS Y GRANULADO	27	12	44,44	11	40,74	-	-	4	14,81				
EXTRACTO FLUIDO	3	-	-	-	-	-	-	3	100				
TOTAL DE MUESTRAS	324	177	54,62	100	30,86	25	7,71	22	6,79				

Tabla III-9 - Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias aerobias esporuladas (método de filtración)

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA								
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000		
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
JARABES	39	29	74,35	8	20,52	-	-	-	-	
SÓLUCIONES	42	42	100	-	-	-	-	-	-	
TOTAL DE MUESTRAS	81	71	87,65	8	9,87	-	-	-	-	

Tabla III-10- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias anaerobias viables (método de placa).

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
COMPRESIDOS	99	88	88,88	11	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-
GRAGEAS	42	31	73,80	8	19,04	3	7,14	-	-	-	-	-	-
CAPSULAS	69	61	88,40	7	10,14	1	1,44	-	-	-	-	-	-
JARABES	39	36	92,30	2	5,12	1	2,56	-	-	-	-	-	-
SOLUCIONES	45	42	93,33	3	6,66	-	-	-	-	-	-	-	-
POLVOS Y GRANULADO	27	22	81,48	4	14,81	1	3,70	-	-	-	-	-	-
EXTRACTO FLUIDO	3	-	-	-	-	3	100	-	-	-	-	-	-
TOTAL DE MUESTRAS	324	280	86,41	35	10,80	9	2,77	-	-	-	-	-	-

Tabla III-11- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias anaerobias viables.
(método de filtración).

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%				
JARABES	39	38	97,43	1	2,56	-	-	-	-	-	-		
SOLUCIONES	42	42	100	-	-	-	-	-	-	-	-		
TOTAL DE MUESTRAS	81	80	98,76	1	1,23	-	-	-	-	-	-		

Tabla III-12: Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por bacterias anaerobias esporuladas (método de placa).

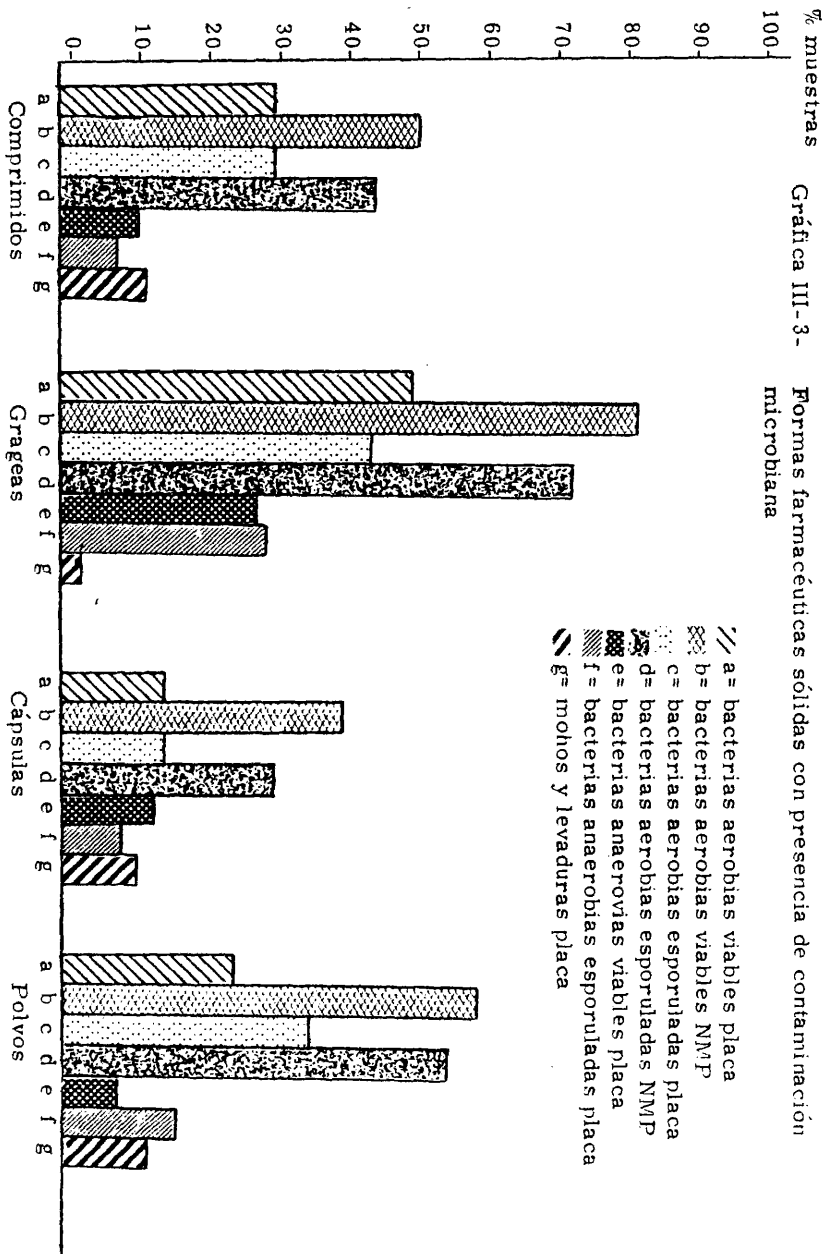
Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLOGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
COMPRESIDOS	99	91	91,91	7	7,07	1	1,01	-	-	-	-	-	-
GRAGEAS	42	30	71,42	10	23,80	2	4,76	-	-	-	-	-	-
CAPSULAS	69	63	91,30	6	8,70	-	-	-	-	-	-	-	-
JARABES	39	37	94,87	2	5,13	-	-	-	-	-	-	-	-
SOLUCIONES	45	44	97,77	1	2,22	-	-	-	-	-	-	-	-
POLVOS Y GRANULADO	27	23	85,18	4	14,81	-	-	-	-	-	-	-	-
EXTRACTO FLUIDO	3	-	-	-	-	3	100	-	-	-	-	-	-
TOTAL DE MUESTRAS	324	288	88,88	30	9,23	6	1,85	-	-	-	-	-	-

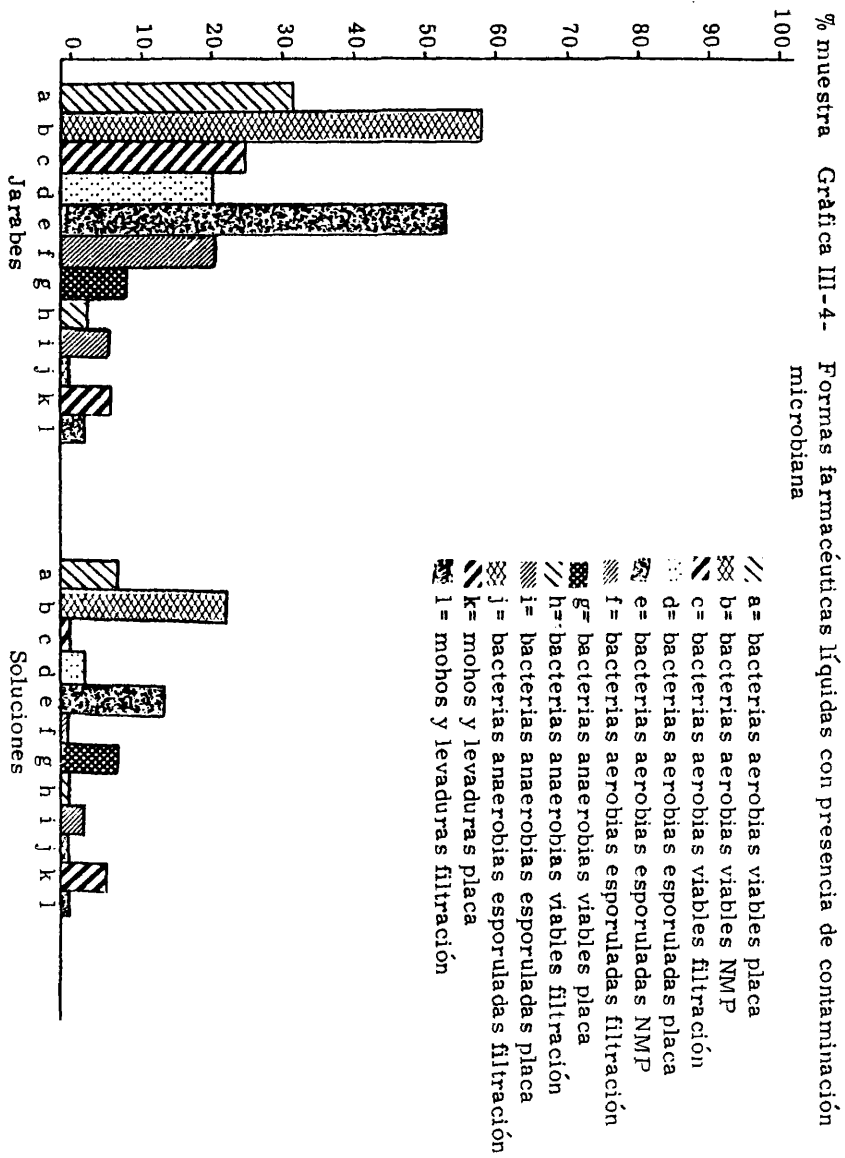
Tabla III-14- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por mohos y levaduras (método de placa).

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLOGICA											
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%				
COMPRESIDOS	99	87	87, 87	9	9, 09	1	1, 01	2	2, 02				
GRAGEAS	42	41	97, 61	1	2, 38	-	-	-	-				
CAPSULAS	69	62	89, 85	6	8, 69	1	1, 44	-	-				
JARABES	39	33	84, 61	-	-	6	15, 31	-	-				
SOLUCIONES	45	43	95, 55	2	4, 44	-	-	-	-				
POLVOS Y GRANULADO	27	24	88, 88	1	3, 70	2	7, 40	-	-				
EXTRACTO FLUIDO	3	-	-	-	-	2	75	1	25				
TOTAL DE MUESTRAS	324	290	89, 50	19	5, 86	12	3, 70	3	0, 92				

Tabla III-15- Grado de contaminación de las formas farmacéuticas por mohos y levaduras. (método de filtración).

Forma farmacéutica	Número de muestras	CATEGORIA MICROBIOLÓGICA								
		Ausencia		< 100		100-1000		> 1000		
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
JARABES	39	38	97,43	1	2,56	-	-	-	-	
SOLUCIONES	42	42	100	-	-	-	-	-	-	
TOTAL DE MUESTRAS	81	80	98,76	1	1,23	-	-	-	-	





3. 6. GRADO DE HOMOGENEIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS MEDICAMENTOS.

El grado de homogeneidad, desde el punto de vista microbiológico, se ha considerado haciendo una comparación de las cifras obtenidas en las 3 muestras A, B y C, que corresponden a un medicamento del mismo lote. Así se ha denominado un medicamento "homogéneo" cuando los valores de los recuentos en las 3 muestras no han variado en una unidad logarítmica, "homogeneidad media" si han variado en una unidad logarítmica y "no homogéneo" cuando estas cifras han variado en dos o más unidades logarítmicas.

En la tabla III-16 se puede observar que las soluciones han sido los preparados, microbiológicamente, más homogéneos (80%). Los comprimidos y jarabes son las formas farmacéuticas con mayor número de preparados "no homogéneos".

Tabla III- 16 Homogeneidad microbiológica de los medicamentos.

Forma farmacéutica	Número de medicamentos	Homogéneo		Homogeneidad media		No homogéneo	
		nº	%	nº	%	nº	%
Comprimidos	33	18	54,54	14	42,42	1	3,03
Grageas	14	8	57,14	6	42,85	-	-
Cápsulas	23	16	69,56	7	30,43	-	-
Jarabes	13	8	61,53	4	30,76	1	7,69
Soluciones	15	12	80	3	20	-	-
Polvos y Granulado	9	6	66,66	4	44,44	-	-
Total	108	68	62,96	38	35,18	2	1,85

3.7. MEDICAMENTOS NO ACEPTADOS EN FUNCION DE DIFERENTES CIFRAS LIMITES DE MICROORGANISMOS.

En la tabla III-17 se expresa el porcentaje de muestras de cada forma farmacéutica, que podían considerarse no aceptables según su contenido microbiano.

Se han establecido 3 cifras límites de microorganismos: más de 100, más de 1.000 y más de 10.000 por gramo o mililitro, según los criterios adoptados por diferentes autores (8) (41) (66) (94) (141) (158) (164), Farmacopeas (62) (72) y organismos nacionales e internacionales (82) (84) (145).

- Si la cifra límite de bacterias se fija en 100 por gramo o mililitro el 13,88% de las muestras por el método de placa y el 22,83% por el método del NMP serían rechazables. Las grageas, jarabes y polvos fueron las formas farmacéuticas con mayor porcentaje de muestras no aceptadas.

- Si la cifra límite de bacterias se fija en 1.000 por gramo o mililitro, el 5,24% de las muestras por el método de placa y el 10,8% por el método del NMP serían rechazables. Las grageas y polvos fueron las formas farmacéuticas con mayor porcentaje de muestras no aceptadas.

- Si la cifra límite de bacterias se fija en 10.000 por gramo o mililitro el 0,61% de las muestras por el método de placa y el 3,08% por el método del NMP serían rechazables.

- En cuanto a la contaminación fúngica si la cifra límite se fija en 100 hongos por gramo o mililitro, el 3,70 de las muestras no serían aceptables. Los jarabes fueron la forma farmacéutica con mayor proporción de muestras rechazables, 15,38%. En los comprimidos 2,02% de las muestras han tenido valores de más de 10.000 hongos por gramo.

Tabla III-17
Porcentaje de muestras de medicamentos no aceptados según diferentes cifras límites de microorganismos.

Forma farmacéutica	No de muestras	Número de microorganismos / g o ml									
		> 100		> 1.000		> 10.000		> 100.000		> 1.000.000	
		Bacterias aerobias placa	NMP	Mohos y levaduras	Bacterias aerobias placa	NMP	Mohos y levaduras	Bacterias aerobias placa	NMP	Mohos y levaduras	Bacterias aerobias placa
Comprimidos	99	9,09	23,23	3,03	3,03	8,08	3,03	2,02	2,02	9,52	2,02
Grageas	42	28,57	42,85		11,90	28,57				9,52	
Cápsulas	69	13,04	15,94		2,39	8,69				4,34	
Jarabes	39	17,94	28,20	15,38	2,56	5,12	15,38				
Soluciones	45	2,22	6,66			2,22					
Polvos y Granulado	27	14,80	18,51		11,11	11,11				11,11	
Extracto fluido	3	100	100	100	100	100	33,33				
Total	324	13,88	22,83	3,70	5,24	10,80	3,08	0,61	3,08	0,61	

3.8. MICROORGANISMOS AISLADOS DE LOS MEDICAMENTOS.

En los medicamentos estudiados se han aislado como contaminantes especies del género Bacillus en el 35,18%, Staphylococcus en el 17,74%, hongos en el 14,81 %, Micrococcus en el 12,03% y Streptococcus en el 1,86% de los preparados.

3.8.1. IDENTIFICACION DE BACTERIAS

- Bacillus

Se ha estudiado los caracteres morfológicos y el perfil bioquímico de 218 cepas del género Bacillus. Para su identificación se han seguido los criterios de clasificación de Smith y Gordon (178), Wolf y Baker (199), Lemille (132), de Barjac y Bonnefoi (15), Cowan (55) y la 8ª edición del Manual Bergey (37). Se han identificado 19 especies distintas que se especifican junto con las características en la tabla III-18. El % de cepas identificadas de cada una de las especies del género Bacillus se expresa en la gráfica III-5; siendo la especie B. subtilis la de mayor frecuencia.

Las variaciones bioquímicas que han presentado estas cepas en relación con las características descritas para la cepa tipo de cada especie, se reflejan en la tabla III-19. El total de las cepas, expresado en %, que coinciden con la cepa tipo ha sido 25,68%. Presentan variaciones en la producción de ácido de lactosa 26,60% a la presencia de lecitina el 14,67% y de ureasa el 11,46%. Si tenemos en cuenta las especies con un número de cepas superior a 5, que representan el 93,11% del total, la especie que ha presentado mayor número de cepas con variación fue el B. badius y los de mayor semejanza B. circulans, B. pumilus y B. licheniformis.

- Staphylococcus.

Se ha estudiado el perfil bioquímico y las pruebas de sensibilidad de 24 cepas del género Staphylococcus aisladas de los medicamentos. Para su identificación se han seguido los criterios de Baird-Parker

(9) (10) (11) (12), Evans y Kloos (74), Kloos y Schleifer. (118)(119), Schleifer y Kloos (173) (174) y del Comité Internacional de Sistemática (112). Se han identificado 5 especies distintas del género Staphylococcus (tabla III-20). El 45,83% de las cepas estudiadas coinciden en sus caracteres bioquímicos y pruebas de sensibilidad con las características descritas para la cepa tipo.

- Micrococcus.

Se ha estudiado el perfil bioquímico, las pruebas de sensibilidad y pigmento de 22 cepas del género Micrococcus aisladas de los medicamentos. Para su identificación se han seguido los criterios de la 8ª edición del Manual Bergey (37). Se han identificado 3 especies distintas del género Micrococcus (tabla III-21).

- Streptococcus.

Se ha estudiado el perfil bioquímico y las pruebas de crecimiento en diferentes condiciones y medios de 2 cepas del género Streptococcus. Para su identificación se han seguido los criterios de la 8ª edición del Manual Bergey (37). Las dos cepas aisladas se han identificado como: S. uberis y S. faecium (tabla III-22).

3.8.2. IDENTIFICACION DE MOHOS Y LEVADURAS.

Se han estudiado los caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos de 18 cepas de hongos, una de ellas levaduras y las 17 restantes mohos. Para su identificación se han seguido los criterios de clasificación de Barnett (16), Ajello (2) y del "Committee on continuing education American Society for Microbiology" (52)

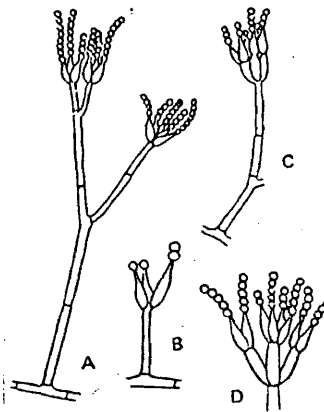
Los hongos aislados de las muestras se han identificado a nivel de género, por los métodos ya descritos 2.4.7.3. Las características de los géneros identificados son las siguientes:

Penicillium

Los conidióforos salen del micelio individualmente de uno en uno, en ramas próximos al ápice, con su forma característica de pincel, terminando en fiálides.

Los conidios (fialosporas) hialinas o con brillo coloreado, son unicelulares y en forma globosa u ovoide.

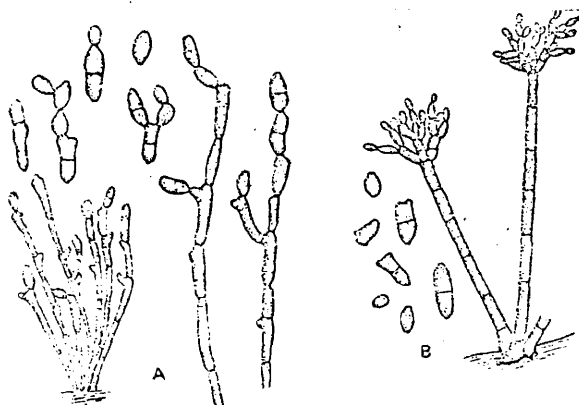
Colonias de crecimiento rápido, al principio son blancas, pero después toman color verde azulado y aspecto muy polvoriento debido a la abundante producción de esporas a partir del micelio aéreo.



PENICILLIUM

Cladosporium

Conidióforos altos y erectos de tonos oscuros y de forma variada ramificados, compuestos o sencillos. Los conidios (blastosporas) son oscuros, unicelulares o bicelulares y que varían en forma y tamaño de ovoide a cilindro e irregular, algunos con una forma típica de limón, a menudo presen-

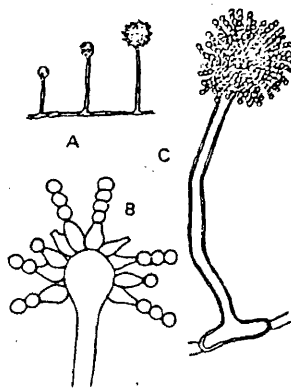


CLADOSPORIUM

tan cadenas sencillas o ramificadas, y pueden ser parásitos o saprofitos de plantas superiores.

Aspergillus

La estructura portadora de los conidios es una hifa, no tabicada ni ramificada, simple, que termina en una cabezuela globosa y que nace en el micelio, esta cabezuela es la portadora de las fiálides, que se asientan en el ápice o en forma radiada por toda la superficie. Los conidios (fialosporas) son unicelulares, globosos y frecuentemente son coloreados.



ASPERGILLUS

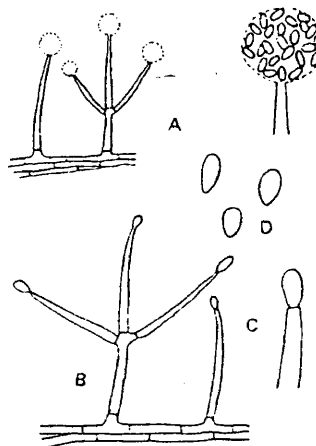
La colonia no es de crecimiento muy rápido y al principio es blanca, y después verde azulada con áreas amarillo azufre diseminados sobre la superficie.

Cephalosporium

Conidióforos delgados, no ramificados, la mayoría de las veces simples, portadores de conidios agrupados en racimos esféricos en su extremo. Los conidios (fialosporas) son hialinos y de una sola célula generalmente.

Las microsporas de algunas especies de Fusarium se pueden confundir con ellos, por su gran similitud.

La colonia tiene un crecimiento moderado, y al principio es compacta.



CEPHALOSPORIUM

de color rosa intenso, pero pronto se cubre de un micelio aéreo, blanco y liso.

Rhodotorula

Hongo levaduriforme cuyas colonias son de aspecto mate, no abultado y de color rosa.

El género Penicillium ha estado presente en los medicamentos: 17, 21, 35, 83, 96, 104 y 107; el género Cladosporium en: 4, 6, 24, 104 y 107; el género Aspergillus en: 10, 50, 56 y 80 y el género Cephalosporium en el 75.

La cepa de levadura se aisló del medicamento 61 y se identificó como posible Rhodotorula.

Tabla III-18 Morfología y perfil bioquímico de las cepas aisladas del género *Bacillus*

Medicamento	Cepa	Acetoina	Glucosa	Arabinosa	Xilosa	Anaerobiosis	Almidón	Caseína	Gelatina	Lecitina	Nitratos	Urea	Citratos	Sacarosa	Manitol	Lactosa	Catalasa	Esporas	Indol	Movilidad	APP	Tan.año	Pigmentació.	Brillo	Borde	ESPECIE
4	4a	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	OvC	-	+	-	M	-	+	L	<i>B. pumilus</i>
	4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	OvC	-	+	-	M	-	+	L	<i>B.adius</i>
	6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	OvC	-	+	-	M	-	+	R	<i>B.adius</i>
6	6b	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	G	-	-	R	<i>B.licheniformis</i>
	6c	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	OvC	-	d	-	M	+	+	L	<i>B. coagulans</i>
	10a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	G	-	+	L	<i>B. pumilus</i>
10	10b	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	-	-	R	<i>B. subtilis</i>
	10c	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	+	-	R	<i>B. subtilis</i>
	10d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	OvC	-	+	-	M	-	+	R	<i>B. brevis</i>
	10e	-	+	-	-	-	-	+	+	+	d	+	-	-	-	-	+	OvC	-	+	-	G	-	+	R	<i>B. firmus</i>
	10f	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	OvC	-	+	-	M	-	+	L	<i>B. laryae</i>
	11a	-	-	-	-	-	-	d	+	+	-	+	-	-	-	+	+	OvC	-	+	-	M	-	+	L	<i>B. brevis</i>
11	11b	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	d	+	OvC	-	+	-	M	-	-	R	<i>B. subtilis</i>
	11c	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	OvC	-	+	+	G	+	-	L	<i>B. megaterium</i>
	11d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	m	-	+	R	<i>B. licheniformis</i>
	12a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	+	-	R	<i>B. subtilis</i>
12	12b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	+	-	R	<i>B. subtilis</i>

Tabla III-18. continuación

Medicamento	12c	12d	12e	13a	13b	13c	17a	17b	17c	17d	17e	17f	18a	18b	18c	18d	20a	20	ESPECIE
Cepa	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>B. brevis</i>
Acetoina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Glucosa	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Arabinosa	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Xilosa	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Anaerobiosis	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Almidón	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Lecitina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Urea	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	d	d	d	d	d	d	<i>B. brevis</i>
Citratos	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Sacarosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Manitol	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Lactosa	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Esporas	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	<i>B. brevis</i>
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. brevis</i>
Movilidad	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
APP	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Tamaño	M	M	m	M	M	M	M	G ^a	G ^a	M	M	M	G	M	M	M	M	M	<i>B. brevis</i>
Pigmentación	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Brillo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. brevis</i>
Borde	L	L	L	L	L	L	R	L	L	R	R	L	L	R	L	L	R	R	<i>B. brevis</i>

Tabla III-18. continuación

Medicamento	24		25							31																		
Cepa	24b	+	24b	+	25a	-	25b	+	25c	-	25d	-	25e	-	25f	-	25i	-	25j	-	31a	+	31b	+	31c	+	31d	+
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobiosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esporas	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-	OvC ⁽¹²⁾	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
APP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tan.año	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Pigmentació.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brillo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Borde	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
ESPECIE	<i>B. coagulans</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. pumilus</i>		<i>B. licheniformis</i>		<i>B. circulans</i>		<i>B. brevis</i>		<i>B. licheniformis</i>		<i>B. coagulans tipo A</i>		<i>B. coagulans</i>		<i>B. megaterium var. flexus</i>		<i>B. circulans</i>		<i>B. circulans</i>		<i>B. pulvifaciens</i>		<i>B. licheniformis</i>	

Tabla III-18. continuación.

Medicamento	Cepa	Acetoina	Glucosa	Arabinosa	Xilosa	Anaerobiosis	Almidón	Caseína	Gelatina	Lecitina	Nitratos	Urea	Citratos	Sacarosa	Manitol	Lactosa	Catalasa	Esporas	Indol	Movilidad	APP	Tan.año	Pigmentació.	Brillo	Borde	ESPECIE
39	39c	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	OvC	-	+	-	M	-	+	L	<i>B. licheniformis</i>
	39d	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	OvC	-	-	+	M	+	+	L	<i>B. megaterium var. flexus</i>
	39e	+	+	+	+	-	+	+	-	-	d	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	+	+	R	<i>B. subtilis</i>
40	39f	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	d	+	+	-	-	+	OvC	-	+	-	P	+ ^b	+	L	<i>B. freudenreichii</i>
	40a	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	d	+	+	-	-	+	OvC	-	+	-	M	-	+	R	<i>B. subtilis</i>
	40b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	OvC	-	+	-	G	+	+	L	<i>B. coagulans tipo A</i>
44	40c	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+	-	+	+	OvC	-	+	-	M ^a	-	+	R	<i>B. licheniformis</i>
	44a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	-	-	R	<i>B. licheniformis</i>
	44b	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	-	+	R	<i>B. licheniformis</i>
	44c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	d	+	-	+	-	+	OvC	-	+	-	P	+	+	L	<i>B. brevis</i>
	44d	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	OvC	-	+	-	G ^a	-	-	R	<i>B. brevis</i>
	44e	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	m	-	+	R	<i>B. brevis</i>
	44f	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	OvC	-	+	-	M	-	-	R	<i>B. licheniformis</i>
44g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	-	-	+	OvC	-	-	-	M	+	+	L	<i>B. aneurinolymphicus</i>	
44h	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	OvC	-	d	-	M	+	+	R	<i>B. subtilis</i>
44i	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	-	-	R	<i>B. pumilus</i>
44j	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	OvC	-	+	-	M	-	-	R	<i>B. pumilus</i>

Tabla III-18. continuación

Medicamento	44		45										46				
Cepa	44k	44l	44m	45a	45b	45c	45d	45e	45f	45g	45h	45i	45j	46a	46b	46c	46d
Acetoina	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Xilosa	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Anaerobiosis	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecitina	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Nitratos	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	d	d	+	+	+	d	-	+	+	-	-	+	+	+	d	-	+
Citratos	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Lactosa	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esporas	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
APP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tan.año	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Pigmentación	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Brillo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Borde	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ESPECIE	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i> var. <i>flexus</i>	<i>B. megaterium</i> var. <i>flexus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pulvifaciens</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. pantothenicus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>

Tabla III-18. continuación.

Medicamento	75		76		78		79		80		81	ESPECIE
Cepa	75d	75e	76a	76b	78a	78b	79a	79b	80a	80b	81a	<i>B. polymyxa</i>
Acetoina	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	
Glucosa	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	
Arabinosa	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	
Xilosa	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	
Anaerobiosis	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
Almidón	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	
Caseína	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
Gelatina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
Lecitina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Nitratos	+	d	-	-	+	+	+	d	d	+	+	
Urea	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Citratos	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
Sacarosa	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
Manitol	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
Lactosa	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Esporas	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Movilidad	+	+	+	-	-	d	+	d	+	+	+	
APP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tan.año	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	G	
Pigmentació.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Brillo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Borde	L	R	L	L	L	L	L	L	L	L	R	
	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. coagulans</i> tipo B	<i>B. coagulans</i> tipo B	<i>B. coagulans</i> tipo A	<i>B. megaterium</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. coagulans</i> tipo B	<i>B. subtilis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. firmus</i>

Tabla III-18. continuación

Medicamento	81		91		98		99		101		103		ESPECIE						
Cepa	81b	81c	91a	91b	91c	98a	98b	99a	99b	99c	101a	101b	101c	101d	101e	103a	103b	103c	
Acetoina	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobiosis	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecitina	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	-	+	-	+	+	-	-	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	-	+	+	d	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citratos	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esporas	OvC ⁽²⁾	OvC	OvC	OvC ⁽¹⁾	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
APP	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tan.año	G	Ga	M	M	M ^A	m	M	M	M	M	M	M	M	M	M	m	M	M	M
Pigmentació.	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brillo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Borde	L	L	R	R	R	L	L	L	L	R	R	R	R	R	L	R	R	R	L

Tabla III-18 continuación.

Medicamento	103		104																
Cepa	103d	103e	104a	104b	104c	104d	104e	104f	104g	104h	104i	104j	104k	104l	104m				
Acetoina	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-				
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Arabinosa	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Anaerobiosis	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Almidón	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Caseína	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Gelatina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Lecitina	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Nitratos	-	d	+	+	-	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d				
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Citratos	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Esporas	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC	OvC				
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
APP	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Tan.año	M	M	M	M	G ^a	G ^a	G ^a	G ^a	G ^a	G ^a	G ^a	G ^a	G ^a	G ^a	M				
Pigmentació.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Brillo	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Borde	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R				
ESPECIE	<i>B. circulans</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. megaterium var. flexus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. cereus var. albolactis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. firmus</i>

Gráfica III-5. Distribución porcentual de las especies de Bacillus aisladas e identificadas en los medicamentos,

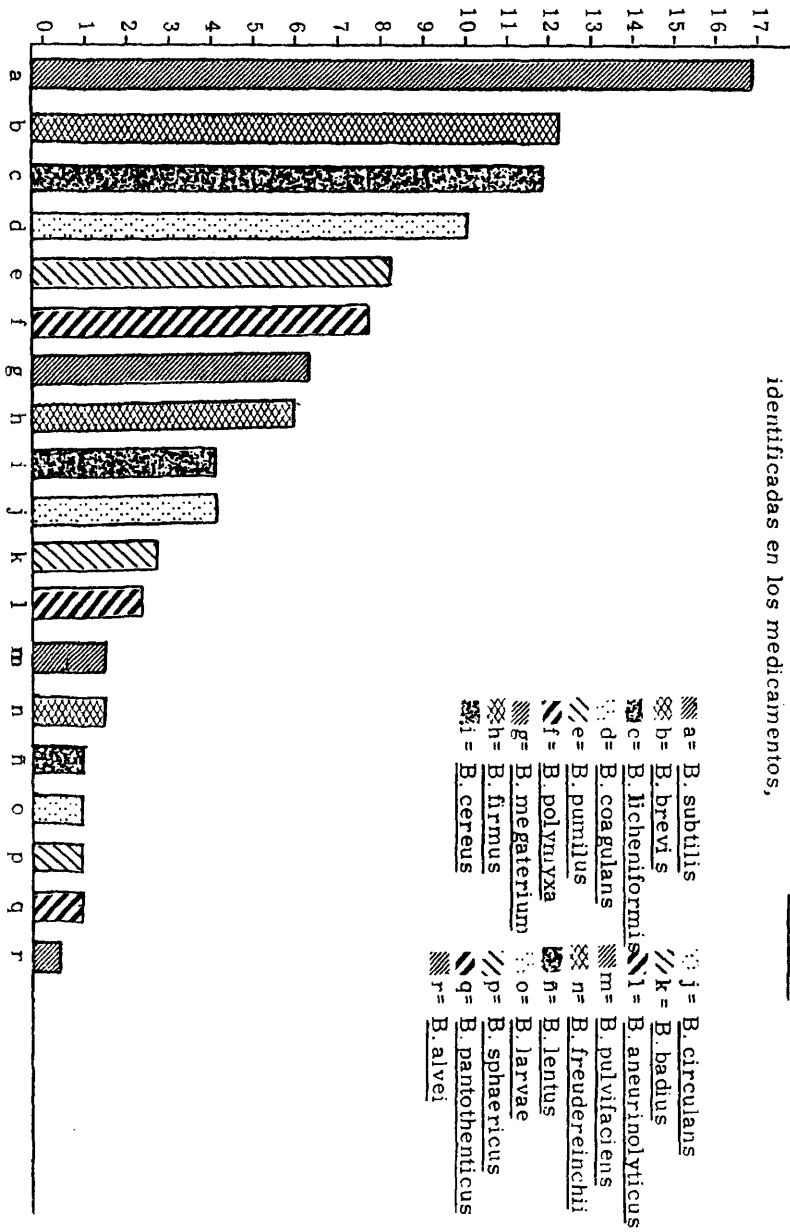


Tabla III- 19

Variaciones bioquímicas de las especies de Bacillus respecto a las cepas tipo

Especie	No de cepas	Variaciones respecto a la cepa tipo															
		Coinciden con la cepa tipo		Acetoina	Glucosa	Arabinosa	Xilosa	Almidón	Caseína	Gelatina	Lecitina	Nitratos	Urea	Citratos	Sacarosa	Manitol	Lactosa
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
<i>B. subtilis</i>	37	24,32	-	-	5,40	-	-	-	-	-	37,83	-	-	-	2,70	2,70	52,16
<i>B. brevis</i>	27	14,81	37,03	-	22,22	22,22	-	-	-	-	-	-	-	-	29,62	-	11,11
<i>B. licheniformis</i>	26	38,46	3,84	-	3,84	-	19,23	-	-	-	11,53	-	-	-	-	-	53,84
<i>B. coagulans</i>	22	36,36	-	9,09	-	-	-	-	-	36,36	9,09	-	27,27	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	18	38,88	-	-	-	-	-	-	11,11	-	-	-	22,22	11,11	-	-	21,77
<i>B. polymyxa</i>	17	23,52	-	-	-	-	-	-	11,76	-	-	11,76	47,05	-	-	11,76	17,64
<i>B. megaterium</i>	14	21,42	7,14	-	-	-	-	7,14	21,42	-	28,57	-	-	7,14	7,14	-	35,71
<i>B. firmus</i>	13	7,69	7,69	-	-	-	-	-	15,38	-	46,15	15,38	23,07	-	38,46	46,15	38,46
<i>D. cereus</i>	9	11,11	-	-	33,33	-	-	11,11	-	-	11,11	-	-	44,44	22,22	-	-
<i>B. circulans</i>	9	44,44	11,11	-	-	-	11,11	11,11	-	-	11,11	-	11,11	-	-	-	-
<i>D. badius</i>	6	-	33,33	-	-	-	16,66	-	83,33	66,66	16,66	-	16,66	-	-	-	-
<i>B. aneurinolyticus</i>	5	20	40	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-
<i>B. polyifaciens</i>	3	33,33	-	-	-	66,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. freudenreichii</i>	3	-	66,66	-	-	-	33,33	-	33,33	-	-	-	-	-	33,33	-	-
<i>B. lentus</i>	2	-	-	50	-	-	-	-	-	50	-	-	50	-	-	-	50
<i>B. larvae</i>	2	-	50	-	-	-	50	-	-	-	-	-	50	-	-	-	100
<i>B. sphaericus</i>	2	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. nantolenticus</i>	2	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
<i>B. alvei</i>	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de cepas	218	25,68	9,63	2,29	5,50	6,42	3,66	6,88	5,96	14,67	1,83	11,46	3,21	11,01	4,58	26,60	

Tabla III-20 Perfil bioquímico, pruebas de sensibilidad de las cepas aisladas del género *Staphylococcus*

Cepa	O/F	Tioglicolato (Anaer.)	Sensibilidad lisostafina	Acido de glicerol	Coagulasa	Hemólisis	Novobiocina	DNasa termoestable	Fructosa	Manosa	Maltosa	Lactosa	Trehalosa	Manitol	Xilitol	Xilosa	Sacarosa	Urea	V. P.	Nitratos	Fosfatasa	Especie
4d	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
6e	++	+	+	+	-	-	S	-	+	d	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
10g	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
11f	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
13d	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. simulans</i>
13e	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
18e	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. hominis</i>
18f	++	+	+	+	-	-	R	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	<i>S. cohnii</i>
18g	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. simulans</i>
21n	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
21p	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. hominis</i>
25h	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. simulans</i>
31h	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
33f	-	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. capitis</i>
39a	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
41a	++	+	+	+	-	-	R	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. cohnii</i>
41d	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
47d	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
48f	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. hominis</i>
48g	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. capitis</i>
98c	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
98e	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. simulans</i>
99d	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. epidermidis</i>
101f	++	+	+	+	-	-	S	-	+	+	+	+	-	-	-	-	d	+	-	+	+	<i>S. hominis</i>

Tabla III-21 Perfil bioquímico, pruebas de sensibilidad y pigmento de las cepas aisladas del género *Micrococcus*.

Cepa	O/F	Tioglicolato (Anaero.)	Sensibilidad lisostafina	Acido de glicerol	Arginina (NH ₃)	Novobiocina	Xilosa	Pigmento	Especie
6d	-	-	-	-	-	S	+	blanco	<i>M. varians</i>
21o	-	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>
21q	-	-	-	-	-	S	-	amarillo	<i>M. luteus</i>
21r	+	-	+	-	-	S	+	blanco	<i>M. varians</i>
25g	+	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>
25k	-	-	-	-	-	S	-	amarillo	<i>M. luteus</i>
31i	-	-	-	-	-	S	-	blanco	<i>M. luteus</i>
31j	-	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>
33g	-	-	-	-	-	S	+	blanco	<i>M. varians</i>
33h	-	-	-	-	-	S	-	amarillo	<i>M. luteus</i>
39g	-	-	-	-	-	S	-	amarillo	<i>M. luteus</i>
41b	-	-	-	-	+	S	+	blanco	<i>M. varians</i>
41c	-	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>
46e	-	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>
46f	-	-	-	-	-	S	+	blanco	<i>M. varians</i>
47e	-	-	-	-	-	S	-	amarillo	<i>M. luteus</i>
47f	-	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>
54p	-	-	-	-	-	S	-	blanco	<i>M. luteus</i>
98d	-	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>
99e	-	-	-	-	-	S	-	blanco	<i>M. luteus</i>
99f	-	-	-	-	-	S	-	naranja	<i>M. roseus</i>
101g	-	-	-	-	-	S	-	rosa	<i>M. roseus</i>

Tabla III-22 Perfil bioquímico y pruebas de crecimiento en diferentes condiciones y medios de las cepas aisladas del género *Streptococcus*.

Arginina (NH ₃)	Hemólisis	Crecimiento		Crecimiento en medio				Resistencia al calor (50°)	Arabinosa	Sorbitol	Esculina	Liturato	Especie	Cepa
		10°C	45°C	Leche Sherman	con 6,5% de ClNa	con 40% de bilis	pH a 9,6							
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>S. faecium</i>	11e
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	<i>S. uberis</i>	54n

3. 8. 3. DISTRIBUCION DE LAS CEPAS DE MICROORGANISMOS EN LAS FORMAS FARMACEUTICAS.

En la tabla III-23 se refleja la distribución de las especies del género Bacillus en las formas farmacéuticas. Este género ha estado presente en todas ellas; los comprimidos y grageas han sido los preparados que han tenido mayor número de cepas y especies distintas.

En la tabla III-24 se expresa el número y % de cada una de las especies del género Staphylococcus y su frecuencia en cada una de las formas farmacéuticas. Han estado presentes en todas las formas sólidas; siendo la especie más frecuente S. epidermidis. Los comprimidos han sido los preparados que mayor número de cepas y especies distintas de este género han tenido.

En la tabla III-25 se expresa el número y % de cada una de las especies del género Micrococcus y su frecuencia en cada una de las formas farmacéuticas. Han estado presentes en todas las formas sólidas; siendo la especie más frecuente M. roseus. Los comprimidos y grageas han sido los preparados con mayor número de cepas y especies distintas de este género.

En la tabla III-26 se expresa el número y % de cada uno de los géneros de mohos y levaduras y su proporción en cada una de las formas farmacéuticas. Han estado presentes en todas las formas farmacéuticas y los comprimidos han sido los preparados con mayor número de cepas y géneros distintos. El género Penicillium fue el más frecuente (38, 88%).

Tabla II-23 Porcentaje de las especies de *Bacillus* aisladas en las diferentes formas farmacéuticas

Especie	Comprimidos		Grageas		Cápsulas		Jarabes		Soluciones		Polvos		Extracto fluido	
	no cepas	%	no cepas	%	no cepas	%	no cepas	%	no cepas	%	no cepas	%	no cepas	%
<i>B. subtilis</i>	13	18,30	8	15,68	5	20,83	4	15,38	1	33,33	3	10,34	3	21,43
<i>B. brevis</i>	12	16,90	4	7,84	5	20,83	1	3,85	-	-	3	10,34	2	14,28
<i>B. licheniformis</i>	10	14,08	9	17,64	1	4,16	1	3,85	-	-	3	10,34	2	14,28
<i>B. coagulans</i>	8	11,26	5	9,80	-	-	6	23,07	1	33,33	1	3,45	1	7,14
<i>B. pumilus</i>	6	8,45	4	7,84	3	12,50	1	3,85	-	-	4	13,79	-	-
<i>B. polymyxa</i>	5	7,04	2	3,92	2	8,33	3	11,54	-	-	4	13,80	1	7,14
<i>B. megaterium</i>	4	5,63	4	7,84	-	-	2	7,69	-	-	2	6,89	2	14,28
<i>B. firmus</i>	5	7,04	-	-	2	8,33	2	7,69	1	33,33	3	10,34	-	-
<i>B. cereus</i>	1	1,40	3	5,88	2	8,33	-	-	-	-	2	6,89	1	7,14
<i>B. circulans</i>	5	7,04	-	-	-	-	1	3,85	-	-	3	10,34	-	-
<i>B. badius</i>	3	4,22	-	-	1	4,16	2	7,69	-	-	-	-	-	-
<i>B. aneurinolyticus</i>	-	-	1	1,96	2	8,33	1	3,85	-	-	-	-	1	7,14
<i>B. pumilus</i>	2	2,81	1	1,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. freudenreichii</i>	-	-	1	1,96	-	-	1	3,85	-	-	1	3,45	-	-
<i>B. lentus</i>	1	1,31	1	1,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. larvae</i>	1	1,40	-	-	1	4,16	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i>	-	-	2	3,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pantothenicus</i>	-	-	1	1,96	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7,14
<i>B. alvei</i>	-	-	-	-	-	-	1	3,85	-	-	-	-	-	-
Total de cepas	76		46		24		26		3		29		14	

Tabla III-24 Porcentaje de las especies de Staphylococcus aisladas en las diferentes formas farmacéuticas

Especie	Cepas		Comprimidos		Grageas		Cápsulas		Polvos	
	Cepas		Cepas		Cepas		Cepas		Cepas	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<u>S. epidermidis</u>	12	50	7	50	3	75	-	-	2	50
<u>S. simulans</u>	4	16,66	3	21,42	-	-	-	-	1	25
<u>S. hominis</u>	4	16,66	2	14,28	-	-	1	50	1	25
<u>S. cohnii</u>	2	8,33	1	7,14	1	25	-	-	-	-
<u>S. capitis</u>	2	8,33	1	7,14	-	-	1	50	-	-
Total de cepas	24		14		4		2		4	

Tabla III-25 Porcentaje de las especies de Micrococcus aisladas en diferentes formas farmacéuticas

Especie	Cepas		Comprimidos		Grageas		Cápsulas		Polvos	
	Cepas		Cepas		Cepas		Cepas		Cepas	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<u>M. luteus</u>	8	36,36	4	40	2	28,57	1	100	1	25
<u>M. roseus</u>	9	40,91	3	30	3	42,85	-	-	3	75
<u>M. varians</u>	5	22,73	3	30	2	28,57	-	-	-	-
Total de cepas	22		10		7		1		4	

Tabla III-26 Géneros de mohos y levaduras aislados en las diferentes formas farmacéuticas.

Género	Cepas		Comprimidos		Grageas		Cápsulas		Jarabes		Soluciones		Polvos		Extracto fluido	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<u>Penicillium</u>	7	38,88	2	33,33	1	100	-	-	1	33,33	1	100	1	50	1	50
<u>Cladosporium</u>	5	27,77	3	50	-	-	-	-	-	-	-	-	1	50	1	50
<u>Aspergillus</u>	4	22,22	1	16,66	-	-	2	66,66	1	33,33	-	-	-	-	-	-
<u>Cephalosporium</u>	1	5,55	-	-	-	-	-	-	1	33,33	-	-	-	-	-	-
<u>Rhodotorula</u>	1	5,55	-	-	-	-	1	33,30	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de cepas	18		6		1		3		3		1		2		2	

En la tabla III-27 se expresa el número de microorganismos diferentes y el número de medicamentos que los contienen, así como la forma farmacéutica correspondiente. El mayor número de microorganismos se ha encontrado en un preparado de comprimidos (21 microorganismos)

Tabla III-27

Número de microorganismos diferentes encontrados en los medicamentos.

Número de microorganismos	Número de medicamentos	Forma farmacéutica
1	5	cápsulas, jarabes, soluciones
2	1	comprimidos
3	6	grageas, cápsulas, jarabes, soluciones
4	6	comprimidos, grageas, jarabe, polvo
5	2	comprimidos
6	5	comprimidos, grageas, cápsulas, polvo
7	8	comprimidos, grageas, jarabe, polvo
8	2	comprimidos
9	1	grageas
10	2	comprimidos, grageas
11	1	comprimidos
13	1	grageas
15	1	polvo
16	1	extracto fluido
17	1	cápsulas
21	1	comprimidos

199

IV DISCUSSION

Antiguamente todos los medicamentos eran preparados en la oficina de Farmacia y constituían las "formulas magistrales" que normalmente, eran administradas al paciente en un breve espacio de tiempo.

Actualmente la investigación y preparación de los medicamentos se ha convertido en una actividad muy compleja, fuera del alcance de las Oficinas de Farmacia y cuya realización no puede concebirse más que a escala industrial. De esta forma aparece la "especialidad farmacéutica". Estas "especialidades" son preparadas con antelación, y pueden pasar meses e incluso años hasta que las consume el enfermo, si están contaminadas con microorganismos, no solamente pueden convertirse en inactivas, sino además ser perjudiciales y causar una nueva enfermedad.

Con respecto a la calidad microbiológica, la legislación española distingue dos grandes grupos: preparados que deben ser estériles y aquellos otros en que la esterilidad no es obligatoria. Entre los primeros, están los que, por su administración directa en sangre o en mucosas de gran absorción, como la conjuntiva, la presencia de un número de microorganismos, aunque fuera pequeño, sería muy peligroso.

En el segundo grupo se incluyen aquellos preparados que, por su vía de administración o por su propia naturaleza, a pesar de tener microorganismos, siempre que no estén en gran número, ni sean patógenos, pueden ser destruidos o inhibidos por las defensas del organismo (piel, enzimas y ácidos) o por los factores que concurren en el medicamento (presencia de conservadores, presión osmótica elevada, pH ácido y baja actividad de agua).

Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de estos últimos preparados y está encaminado a determinar cuantos y cuales microor-

ganismos se encuentran en éstos, y así determinar su calidad microbiológica. Dentro de los preparados hemos estudiado los que se administran por vía oral, ya que la mayor parte de los medicamentos se administran por esta vía, la más natural. Además en este grupo se encuentra una gran variedad de formas farmacéuticas. WallhaüBer (194), indicó en un estudio realizado en 1977 que existía un alto porcentaje de formas farmacéuticas de administración oral, y que el 55% está representado por formas sólidas y el 11% por formas líquidas. En este momento, también sucede algo semejante en el mercado nacional.

Para seleccionar las especialidades farmacéuticas, hemos seguido el criterio de escoger al azar diversos preparados de las distintas formas farmacéuticas. No hemos tenido en consideración el tiempo que había transcurrido desde su elaboración, debido a que la vida comercial media en nuestro país es de cinco años y en este intervalo de tiempo es cuando son administrados al paciente. Hemos excluido de nuestro estudio todos los preparados farmacéuticos que tenían en su composición sustancias de naturaleza antibiótica.

Los medicamentos se han agrupado por formas farmacéuticas y no por grupos o actividades terapéuticas. Se ha creído más adecuado para el estudio de la contaminación microbiana, debido a que cada forma farmacéutica tiene un proceso tecnológico específico de preparación y éste puede influir en la calidad microbiológica del preparado.

De los resultados expuestos en la tabla III-1 sobre el estudio microbiológico de 324 muestras de preparados de administración oral, se puede deducir que en general no presentan cifras elevadas de contaminación. No se han detectado microorganismos de ningún tipo en el 45,67% de las muestras. Esto está de acuerdo con Millet (141) que indica, que en este tipo de preparados la contaminación es baja. También Hirsch (107), en su estudio de preparados líquidos encontró valores muy bajos ya que aunque un 82% de estos preparados presentaban contaminación, sólo cuatro preparados tenían valores superiores

a 100 microorganismos por mililitro. Sin embargo Kallings (115) indicó que el 39,4% de las tabletas presentaban elevada contaminación.

Los medicamentos objeto de estudio han sido fabricados según procesos industriales y ésto puede ser la causa de que las cifras no sean tan elevadas como sucede con muchos preparados elaborados en la Oficina de Farmacia (166), en los cuales (pildoras y cápsulas) algunos autores han encontrado recuentos de hasta $1,5 \times 10^6$ bacterias por gramo (64).

De las muestras estudiadas el 50,92% tenían ausencia de bacterias y el 26,23% presentaban menos de 100 bacterias por gramo o mililitro. Estos resultados los podemos comparar con los obtenidos por Desvignes (60) que detectaron el 69% de las muestras con menos de 100 bacterias por gramo o mililitro. También, en su estudio de preparados de administración oral, igual que nosotros encontraron que las grageas era la forma farmacéutica que presentaba mayor número de muestras contaminadas y las soluciones la menor.

Sin embargo, hemos encontrado en algunos preparados cifras muy elevadas de microorganismos. Esto ha sucedido en los medicamentos que tienen en su composición materias primas de origen vegetal como Rauwolfia, Cassia, Prunus o animal, como pancreatina o extractos hormonales y también en un preparado a base de trisilicato de magnesio. Algunos autores (60) (177) han resaltado el alto riesgo de contaminación que presentan los preparados en cuya composición se encuentran materias de estos orígenes. Por este motivo la USP (190) ha dado exigencias microbiológicas para materias primas como polvo de Rauwolfia serpentina, pancreatina y preparados farmacéuticos que las contengan. Así mismo en un estudio realizado en Gran Bretaña en 1971 (70) sobre distintos medicamentos, encontraron que las preparaciones a base de trisilicato de magnesio contenían un gran número de microorganismos.

Para investigar la contaminación microbiana de los preparados, se han utilizado diferentes métodos: recuento en placa, número más probable (NMP) y filtración. No hemos considerado adecuado utilizar un

sólo método, debido al desconocimiento del grado de contaminación, al contenido o no de sustancias antimicrobianas y a la distinta naturaleza de los preparados. Saunder (170), recomienda realizar más de un método para determinar la contaminación, ya que "a priori" es difícil establecer cual es el más adecuado.

Debido a que el método de filtración sólo es posible utilizarlo para preparados líquidos o solubles, se han utilizado los métodos de recuento en placa y número más probable para el resto de los preparados que no tenían estas características, al igual que Fuglsang-Smidt y Ulrich (88). Por éstos métodos se ha realizado la investigación de bacterias aerobias viables mesófilas y hongos, como señala la normativa existente (84) (190). También consideramos necesario investigar la presencia de bacterias aerobias esporuladas mesófilas, por ser éstas muy resistentes a las condiciones adversas como: desecación, agentes antimicrobianos, pH y presión osmótica desfavorable. Otra razón de haber incluido su estudio, se debe a que muchos investigadores (64) (85) (107) (115) (127) (144) (183) han encontrado que el contaminante más frecuente en los preparados farmacéuticos no estériles, era el género Bacillus. En experiencias anteriores hemos podido comprobar que el número de bacterias aerobias esporuladas, en algunos casos, es más elevado que el de bacterias aerobias viables, ya que muchas formas esporuladas, no encuentran las condiciones óptimas para su germinación. Un tratamiento por el calor a 80°C durante diez minutos, activa la germinación de las esporas, como ya observaron Curran y Evans (56)

Es interesante resaltar que en algunas muestras, el recuento de bacterias esporuladas ha presentado cifras ligeramente más elevadas que el de bacterias viables. Por este hecho resaltamos la importancia que tiene, realizar el recuento de bacterias esporuladas; puesto que si sólo se hace el de bacterias viables no se obtienen los valores reales de contaminación en los preparados. Además se ha realizado la investigación de bacterias anaerobias mesófilas tanto viables como esporuladas.

Se ha creído conveniente su estudio por la importancia que tiene el Clostridium perfringens, en preparaciones orales, ya que como señaló Bruch (36), su presencia puede ser más importante que la de Pseudomonas aeruginosa. Otros autores (8) (60) (127) (144) también han incluido la investigación de bacterias anaerobias en los preparados farmacéuticos, aunque ninguna normativa oficial lo especifica. La FIP (82) indica que la investigación de bacterias anaerobias no se debe incluir de una manera sistemática en el estudio microbiológico de este tipo de preparados, debido a que las cifras encontradas por diversos autores (8) (127) (144) han sido bajas en general.

El recuento de bacterias aerobias es el que ha dado, con escasas excepciones, cifras más altas, siendo también la contaminación más frecuente en todos los preparados farmacéuticos. Los valores altos se han encontrado en las siguientes formas farmacéuticas: extracto fluido, grageas y polvos, tanto por el método del NMP como por el de placa.

Los recuentos de bacterias anaerobias han sido siempre más bajos que los obtenidos en bacterias aerobias viables o esporuladas. Las cifras más elevadas se han obtenido en el extracto fluido y grageas y no han sido superiores a 1.000. La causa de ésto es que presentan valores muy altos de bacterias aerobias, siendo algunas de ellas capaces de crecer también en anaerobiosis.

Respecto a los mohos y levaduras los recuentos más elevados se han obtenido en dos muestras de comprimidos (21_A , 21_B), siendo incluso superiores a los obtenidos en bacterias aerobias. También Ludva (132) encontró una muestra de comprimidos que presentaba una contaminación por hongos superior a 50.000 por gramo. Diversos autores afirman (60) (85) (192) (194) que sin una estricta vigilancia de las materias primas es posible encontrar en los comprimidos cantidades superiores de 1.000 a 10.000 hongos por gramo. En el resto de las muestras los valores de hongos han sido más bajos que los encontrados en bacterias aerobias.

De las 35 muestras que presentaron hongos, todas contenían mohos excepto tres (61_A, 61_B, 61_C) que contenían sólo levaduras. En ningún preparado estaban presentes ambos contaminantes juntos. Gallien (89), igual que nosotros, encontró un número muy elevado de muestras de grageas, cápsulas, comprimidos y jarabes, con ausencia de contaminación por hongos. Doce muestras que presentaban hongos no tienen bacterias, corresponden a las formas farmacéuticas de comprimidos, cápsulas, jarabes y soluciones.

Desde el punto de vista de la salud, la presencia de microorganismos patógenos ha sido siempre el principal objeto de atención. Tanto los investigadores como las Farmacopeas y los organismos internacionales, han estado de acuerdo en que debe haber ausencia de microorganismos patógenos como: Salmonella, E. coli, Ps. aeruginosa, S. aureus.

De acuerdo con algunos autores (8) (60) (64) (107) (115) (127) en nuestro estudio hemos incluido también la investigación de otras bacterias indicadoras de contaminación de origen fecal, como el S. faecalis, porque son capaces de sobrevivir a condiciones ambientales y tratamientos más adversos que E. coli y su supervivencia puede ser indicativa de una deficiente calidad higiénica. En preparados que han sufrido algún tratamiento térmico, la investigación de S. faecalis y esporas de Clostridium sulfito reductores, es mejor índice de contaminación fecal que E. coli, puesto que éste se destruye a temperaturas de pasterización, a diferencia de los otros microorganismos que son más resistentes (141). Devleeschouwer (64) señala que se debería incluir la investigación sistemática de S. faecalis, aunque no está en la normativa de la USP (190) FIP (84) BP (33).

En las muestras estudiadas la presencia de los microorganismos patógenos e indicadores de la contaminación fecal investigados (E. coli, Salmonella, Shigella, Ps. aeruginosa, S. aureus y S. faecalis) ha sido negativa. Al igual que Azria (8) y Mosso (144) no hemos encontrado enterobacterias, a diferencia de Desvignes (60) y Hirsch (107).

No se ha encontrado una relación apreciable entre el tipo de envase y la calidad microbiana del medicamento. Aunque en algún caso, como es el tipo "blister", podríamos considerar que existe cierta relación, no se puede afirmar ya que en este envase se envasaron los preparados hormonales, cuya contaminación microbiana, como hemos dicho anteriormente, puede proceder de las materias primas.

Debido a la variedad de microorganismos que están presentes en los preparados estudiados, se ha observado presencia de microorganismos saprofitos en todos los valores de pH, aunque el mayor % de muestras que presentan contaminación bacteriana se encuentra en la zona de pH alcalino (66,66%) y el menor en la de pH ácido (40%). Igualmente el mayor % de muestras con contaminación fúngica ha sido a pH alcalino (22,22%). En otras zonas de pH los valores fueron muy semejantes.

El pH de los medicamentos es sólo uno de los factores que influyen en el desarrollo de los microorganismos y no se puede considerar su efecto sobre ellos, independiente de los demás. Por sí mismo no es eficaz para evitar la contaminación microbiana, si ésta ya existe. Aunque puede inhibir el crecimiento de los microorganismos no los destruye y estos pueden detectarse posteriormente en el análisis cuando se cultivan en las condiciones óptimas.

Una de las causas por la que hemos encontrado mayor % de muestras contaminadas en la zona alcalina, puede ser debido a que, los conservadores más utilizados en la industria farmacéutica son el ácido benzoico y sus derivados (parahidroxibenzoatos). Estos son más activos frente a hongos y bacterias a pH moderadamente ácido y neutro, ya que en estos valores de pH el grado de disociación es muy bajo y las moléculas sin disociar de ácido benzoico atraviesan con mayor facilidad la membrana celular de los microorganismos (14).

Respecto a la presencia de Staphylococcus se han aislado diversas especies que aparecen en su mayoría en los medicamentos que tienen pH neutro y en menor número en los de pH ácido. No aparece nin-

guna en los que tienen pH alcalino, lo que está de acuerdo con Azria (8) en su estudio sobre jarabes. Además del pH, hay otros factores que influyen en el desarrollo de los microorganismos, como son: presión osmótica, presencia de sustancias conservadoras y la actividad de agua (a_w). Respecto a este último factor, los valores son variables para los distintos microorganismos. En bacterias entre 0,81 a 0,99 y para hongos de 0,68 a 0,92 (14).

Los valores medios de a_w obtenidos en las distintas formas farmacéuticas son: comprimidos 0,63; grageas 0,62; cápsulas 0,44; jarabes 0,89; soluciones 0,90; extracto fluido 0,86 y polvos y granulado 0,55. Estos valores son bajos y no permiten el desarrollo de los microorganismos presentes, excepto en el extracto fluido, jarabes y soluciones, donde la a_w puede ser un factor que favorezca el desarrollo de mohos.

En los preparados líquidos, se ha detectado la contaminación microbiana por los métodos de placa, NMP y filtración. Ha sido el método del NMP el que ha detectado mayor porcentaje de muestras con bacterias aerobias viables (aunque las cifras de los recuentos han sido bajas) en relación a los otros métodos, siendo el método de filtración el menos sensible. Por el método del NMP se ha detectado contaminación bacteriana en 19,75% de las muestras más que por el método de placa. Esto podría ser debido a que éstos preparados tienen en general un bajo número de microorganismos, muchos de los cuales pueden tener alterado su equipo enzimático y su crecimiento se ve favorecido en medio líquido. Hess (105) comprobó que el método del NMP era más adecuado para detectar un nivel bajo de contaminación en los preparados farmacéuticos.

En cuanto al recuento de bacterias aerobias esporuladas, el método del NMP ha sido el más eficaz, la sensibilidad fue semejante en el método de placa y filtración. Respecto al recuento de bacterias anaerobias y hongos se han realizado por el método de placa y filtración, no haciéndose por el NMP. La sensibilidad ha sido mayor por el método

de placa que por el de filtración para ambos recuentos.

Azria (8) y Hirsch (107), señalan las ventajas del método de filtración para los preparados líquidos, pero no han realizado su estudio comparativo de diferentes métodos; nos cabe pensar si todas estas ventajas son sólo teóricas puesto que no han sido comprobados experimentalmente por ellos.

El recuento de bacterias aerobias en los preparados sólidos se ha realizado por el método de placa y del NMP (gráfica III-2). También ha sido el método del NMP más sensible que el de placa, ya que el 22,70% de las muestras han presentado contaminación bacteriana por el método del NMP y sin embargo no se ha detectado por el método de placa.

No es fácil establecer una relación entre el grupo terapéutico y la calidad microbiológica, debido a la gran diversidad de componentes que integran cada grupo terapéutico y además por sumarse a veces dos o más acciones en un solo medicamento. Sólo en grupos terapéuticos muy definidos como los preparados hormonales se ha observado una contaminación en el 100% de estos, que puede ser debido a llevar en su composición materias primas de origen biológico. De acuerdo con varios autores (60) (89) (175) serían estas materias las causantes de la contaminación microbiana. También los antiespasmódicos y antiácidos presentan contaminación en el 87,50% y 80% respectivamente y podría deberse a la presencia de materias primas de origen mineral, como el trisilicato de magnesio, que en ocasiones contienen elevada contaminación (70).

Siguiendo criterios semejantes a otros autores (8) (60) (66) se han establecido cuatro categorías, según el contenido microbiológico: ausencia, menor de 100, 100-1.000, más de 1.000 microorganismos por gramo o mililitro (tabla III-4 a III-15).

El porcentaje de muestras que han presentado ausencia de contaminación por bacterias aerobias viables y esporuladas, ha sido muy variable de unas formas farmacéuticas a otras. Las soluciones y las cápsulas han sido las formas farmacéuticas que han presentado mayor pro-

porción de muestras con ausencia de bacterias aerobias viables y esporuladas y el mayor porcentaje de muestras contaminadas se ha presentado en grageas y polvos.

La proporción de muestras con ausencia de bacterias anaerobias ha presentado menor variación que en las aerobias, en las distintas formas farmacéuticas. Han sido las soluciones las que mayor porcentaje de muestras han tenido ausencia de anaerobias y las grageas las que menor. El mayor porcentaje de muestras con ausencia de contaminación fúngica ha correspondido a las grageas y soluciones, siendo los jarabes los preparados con mayor porcentaje de muestras con presencia de hongos.

En la categoría microbiológica menor de 100, para bacterias aerobias, el porcentaje más elevado de muestras, se ha obtenido en polvos, grageas, jarabes y comprimidos. Respecto a la contaminación fúngica han sido los comprimidos y cápsulas las formas farmacéuticas con mayor porcentaje de muestras.

En la siguiente categoría (100-1.000), en el recuento de bacterias aerobias han predominado los jarabes y comprimidos y en hongos el extracto líquido.

En la categoría de más de 1.000, las formas farmacéuticas que han presentado mayor porcentaje de muestras con bacterias aerobias han sido: extracto líquido, grageas y polvos y para hongos se han encontrado en extracto líquido y comprimidos. Hay que destacar que en ninguna muestra se han obtenido valores de anaerobios correspondientes a esta categoría.

Gallien (89) en un estudio de preparados orales encontró menor porcentaje, que nosotros, de muestras contaminadas en todas las categorías. Si comparamos sólo los recuentos de bacterias aerobias, Desvignes (60), al igual que nosotros, encontró que las grageas presentaban mayor porcentaje de muestras en la categoría 1.000 bacterias por gramo.

El extracto fluído, ha sido una forma farmacéutica muy contaminada, pero se han estudiado un bajo número de muestras, en relación con las otras formas farmacéuticas. La causa de la elevada contaminación, opinamos que es debido a las materias primas de origen vegetal, que entran en su composición. El proceso tecnológico empleado (percolación) en su elaboración no ha conseguido disminuirla de manera apreciable. Schiller (177) encontró valores del orden de 10^5 - 10^6 bacterias por gramo en materias primas de origen vegetal (hoja de Sen). Los tratamientos posteriores utilizados para la obtención del extracto disminuyeron la contaminación en una unidad logarítmica.

Las grageas ha sido la forma farmacéutica que tenía mayor número de muestras con presencia de bacterias, esto puede ser debido a un proceso tecnológico más complejo y al elevado número de materias que entran en su elaboración. Pero sin embargo, es la forma farmacéutica con menor contaminación fúngica.

Los polvos y los comprimidos presentan un grado de contaminación semejante, intermedio respecto a las otras formas farmacéuticas. Sin embargo los polvos presentan en todos los recuentos una contaminación algo mayor. Aunque el proceso tecnológico de los comprimidos es más complejo y podría pensarse que influye en un aumento de la contaminación, la experiencia práctica ha demostrado que el proceso de compresión final disminuye el número de microorganismos.

Las cápsulas son las formas sólidas menos contaminadas por bacterias. Esto puede ser debido a las estrictas normas microbiológicas que se exigen para un excipiente fundamental, como es la gelatina (USPXX) (190). También en esta forma farmacéutica la práctica ha demostrado que durante el almacenamiento de las cápsulas vacías se produce una pérdida de agua que influye en la disminución del contenido microbiano.

La contaminación de los jarabes, puede tener su origen en los principios activos, éstos se añaden al jarabe simple, después de elaborado, cuando ha sufrido ya un tratamiento térmico y en este proceso, no es fácil el aumento de contaminación, a no ser por el agua o el azúcar que

se ha empleado como materias primas. Posteriormente si el proceso de filtración no se realiza de forma adecuada, desde el punto de vista microbiológico, puede ser una fuente de contaminación. Aunque los jarabes por su elevada concentración de azúcar, están considerados como preparados que inhiben la proliferación microbiana. Sin embargo, hay componentes como el bálsamo de Tolú que constituyen un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos (150).

Hirsch (107) y Azria (8) en su estudio microbiológico de los jarabes, por el método de filtración, encontraron en general valores muy bajos, con escasas excepciones. Estos investigadores han considerado contaminación, incluso cuando aparecía un solo microorganismo por mililitro. Comparando nuestros resultados obtenidos por filtración, encontramos que el 25,65% de los jarabes tenían bacterias aerobias, el 2,56% bacterias anaerobias y el 2,56% hongos, frente al 92%, 73,5% y 36,5% respectivamente, encontrados por Azria (8). De estos datos se deduce que la calidad microbiológica ha sido mejor en los preparados estudiados por nosotros.

Con el fin de ver la homogeneidad que presentaban los lotes de preparados farmacéuticos, desde el punto de vista microbiológico se han establecido tres niveles: "homogéneo", "homogeneidad media" y "no homogéneo". Hemos creído conveniente tener en cuenta estos criterios, debido a que el concepto de homogeneidad desde el punto de vista de la contaminación microbiana, en un mismo lote de medicamentos, no se ha fijado de una forma clara por ningún investigador y no existen datos bibliográficos sobre este aspecto. El grado de homogeneidad es bueno, como se deduce de los resultados expuestos en la tabla III - 16, puesto que el 62,96% de medicamentos, tengan o no contaminación microbiana son "homogéneos" y el 35,18% han presentado una "homogeneidad media". No presen-

taban homogeneidad dos medicamentos (1,85%), en los cuales las cifras de los recuentos eran muy dispares. Las formas farmacéuticas con mayor homogeneidad microbiana fueron las soluciones y con menor los comprimidos.

La homogeneidad microbiana de los medicamentos puede depender de factores muy diversos: composición, estado físico y proceso tecnológico de cada forma farmacéutica.

Aunque no existan normas oficiales en nuestro país respecto a las exigencias microbiológicas de los preparados no estériles, creemos que es interesante conocer los porcentajes de muestras de cada forma farmacéutica que no presentan una calidad microbiológica aceptable de acuerdo con los criterios seguidos por diversos autores y Farmacopeas.

Si seguimos los criterios de Penso (158) el cual señala, que las formas sólidas deben tener menos de 100 bacterias por gramo, vemos en la tabla III-17, que los valores más altos de muestras no aceptables corresponden a las grageas.

En cuanto a las formas líquidas siguiendo el criterio de Azria (8) para los jarabes, que indica que deben contener menos de 100 bacterias por mililitro, no serían aceptables el 28,20% de las muestras.

Si se fija el límite de bacterias en 1.000 por gramo o mililitro, como han señalado Bühmman (41) y FIP(82) encontramos que siguen siendo las grageas la forma farmacéutica que presenta mayor proporción de muestras que no serían aceptadas. En los preparados líquidos estos valores son más bajos.

Otros autores como Millet y Dony (141), Gay (94), las Farmacopeas: Checoslovaca citada por Azria (8), Alemana (62) y Europea (72), así como la FIP (84), han fijado el límite de bacterias en 10.000 por gramo o mililitro. En este caso el mayor número de muestras no aceptables es para los polvos.

Como indican todos los autores, organismos y Farmacopeas

consultados (41) (62) (72) (82) (132), el límite máximo para hongos ha de ser inferior a 100 por gramo o mililitro. En los preparados estudiados solo el 3,70% presentan valores superiores a esta cifra. Siguiendo este criterio encontramos que los jarabes son, con excepción del extracto fluido, la forma farmacéutica con mayor proporción de muestras no aceptables.

Del total de las muestras analizadas, no serían aceptables, si el límite se establece en 100 bacterias por gramo o mililitro, el 13,88%. Si el límite se fija en 1.000 no serían aceptables el 5,24% y si el límite se establece en 10.000, se rechazarían el 0,61%. Todos estos valores se refieren a los recuentos realizados por el método de placa, sin embargo por el método del NMP el número de muestras no aceptadas es mayor para todas las cifras límite antes mencionadas: 22,83%, 10,80%, 3,08% respectivamente. Si comparamos estos resultados con los obtenidos por Desvignes (60) en preparados farmacéuticos no estériles comercializados en Francia, observamos que la calidad microbiológica de los preparados estudiados por nosotros es superior.

Otro punto en que se ha centrado nuestro estudio ha sido, la identificación de los distintos contaminantes, que estaban presentes en los medicamentos.

Los microorganismos que se encuentran principalmente en las materias primas, aire, agua y materiales de envasado, son bacilos esporulados, bacilos Gram-negativos, micrococos, estafilococos, estreptococos y hongos; estos contaminantes son los que pueden sobrevivir y encontrarse en los preparados elaborados (110) (200).

Dentro de los medicamentos analizados, el contaminante que se ha aislado con mayor frecuencia ha sido el género Bacillus (218 cepas), seguido de Staphylococcus (24 cepas), Micrococcus (22 cepas), hongos (18 cepas) y Streptococcus (2 cepas). Al igual que otros investigadores (8) (127) (144) no se han aislado bacterias anaerobias estrictas.

El género Bacillus se encuentra en el 35,18% de los medicamentos, Staphylococcus en el 17,74%, los hongos en el 14,81%, los Micrococcus en el 12,03% y Streptococcus en el 1, %. Los datos obtenidos en Bacillus y mohos son muy semejantes a los encontrados por Hirsch (107).

Haber encontrado un mayor número de cepas del género Bacillus, se debe a que se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, polvo, aire y agua y por esto es el contaminante más habitual. Frecuentemente se han considerado como microorganismos no patógenos, pero en ocasiones pueden originar infecciones diversas sobre todo en pacientes con terapia inmunosupresora (133). Hirsch (107) en su estudio de preparados líquidos considera la presencia de Bacillus como microorganismos potencialmente patógenos.

Se han identificado un total de 356 cepas pertenecientes al género Bacillus, aunque en los resultados sólo se ha reflejado la morfología y perfil bioquímico de 218 cepas, ya que hemos seguido el criterio de no tener en cuenta las cepas que resultaron ser iguales en cada medicamento. Sin embargo, se han considerado las cepas de la misma especie, que han presentado alguna variación morfológica o bioquímica.

De todos es conocida la dificultad que existe en clasificar con exactitud las especies del género Bacillus debido principalmente a su variabilidad no sólo morfológica, tanto del bacilo como de la colonia, sino también de sus enzimas. El problema se acentúa si se realizan resiembras en distintos medios, operación indispensable para su identificación. En este caso aparecen frecuentemente fenómenos de variabilidad y una misma especie puede presentar colonias lisas y rugosas, esporuladas o no, con o sin pigmento. La dificultad aumenta, al no estar de acuerdo todos los autores en los resultados de los caracteres bioquímicos de muchas especies. Así mismo por falta de datos de algunas especies menos frecuentes.

Por otra parte, algunos autores (96) opinan que al existir en este género muchas estirpes intermedias se originan series de estirpes o espectros, muy difíciles de clasificar, pero que no pueden ser ignoradas. Por ésto la caracterización de una especie de Bacillus, necesita numerosas pruebas que no siempre pueden ser realizadas cuando se trata de identificar un gran número de estirpes. Por todas estas causas nosotros no nos hemos ajustado a un único esquema de clasificación sino que hemos seguido varios, principalmente los de Smith y Gordon (178), Wolf y Barker (199), Lemille (130), Barjac y Bonnefoi (15), Cowan (55) y la 8ª edición del Manual Bergey (37).

Debido a las dificultades expuestas anteriormente en la identificación de estas especies, en la bibliografía consultada no existen apenas datos respecto a las especies encontradas en las distintas formas farmacéuticas. Lambin (126) en su estudio realizado en comprimidos resalta la variedad de especies encontradas: B. subtilis, B. megaterium, B. cereus var. mycoides, B. brevis y B. polymyxa,. Kallings (115) en su estudio sobre tabletas, indicó la presencia de B. subtilis. Hirsch (107) en preparados líquidos encontró que una tercera parte de los contaminantes eran Bacillus, pero no identificó las especies. Willemse-Collinet (198), estudió las especies del género Bacillus aisladas de medicamentos antiácidos alterados.

Devleeschouwer (64) señala que su presencia no es importante desde el punto de vista patógeno, pero si se encuentran en un número muy elevado, tienen importancia por sus productos metabólicos.

En nuestro estudio de diferentes formas farmacéuticas hemos identificado hasta 19 especies distintas admitidas por la 8ª edición del Manual Bergey (37), aunque algunas de ellas están aún incluidas en las especies de clasificación incierta. Como se expresa en la gráfica III-5 el B. subtilis es el de mayor incidencia (16,89%)

Las diversas cepas aisladas presentan una gran variabilidad propia de este género. Por esta razón en las distintas especies han aparecido variantes morfológicas y bioquímicas respecto a los caracteres descritos para la cepa tipo.

La especie B. subtilis ha presentado variabilidad en cinco caracteres bioquímicos: no producen ácido de lactosa, sacarosa, arabinosa y manitol y poseen lecitinasa. Es de resaltar el elevado número de cepas que no han producido ácido de lactosa (62,16%); la variación de este caracter está de acuerdo con Smith (178). También es importante la proporción de cepas productoras de lecitinasa (37,83%). Un 24,32% de las cepas han presentado variación en ambos caracteres bioquímicos. Los otros caracteres bioquímicos que han presentado variación han tenido muy poca incidencia en relación con los anteriormente mencionados.

La especie B. brevis ha tenido variación también en cinco caracteres bioquímicos. Es de resaltar que un 37,03% de las cepas eran productoras de acetoina y un 29,62% no producen ácido de sacarosa; hecho ya descrito por Barjac (15).

Como las dos especies anteriores B. licheniformis ha presentado variación en cinco caracteres bioquímicos. Es de resaltar que el 53,84% de las cepas no producen ácido de lactosa y el 19,23% no hidrolizan el almidón.

La especie B. coagulans ha tenido variación en cuatro caracteres bioquímicos. Hay que destacar que el 36,36% de las cepas licuan la gelatina y que puede inducir a error en la identificación, ya que este caracter sirve como diferenciación de B. firmus.

La especie B. pumilus ha presentado variación en cuatro caracteres bioquímicos. Hay que destacar que el 27,77% de las cepas producen ácido de lactosa y esto está de acuerdo con Lemille (130).

La especie B. polymyxa ha tenido variación en cinco

caracteres bioquímicos. Siendo de destacar el elevado porcentaje de cepas que poseen ureasa 47,05%.

La especie B. megaterium posee muchas estirpes con caracteres bioquímicos y morfológicos variables; así tenemos que han presentado variación en siete caracteres bioquímicos. Es de destacar que un 35,71% de las cepas no producen ácido de lactosa y el 28,57% no poseen lecitinasa. Se han identificado la variedad flexus y variedad carotarum de acuerdo con la 8ª edición del Manual Bergey (37).

La especie B. firmus ha sido la que mayor variabilidad ha presentado respecto a los caracteres de la cepa tipo, lo cual ha sido confirmado por Gordon (96) que considera que las cepas de esta especie forman un espectro con las de B. lentus con características intermedias entre ambas. Siendo de destacar las cepas productoras de lecitinasa (46,15%), las que no reducen los nitratos a nitritos (15,38%) y poseen ureasa (23,07%). Estos dos últimos caracteres tienen importancia para diferenciar esta especie de otras afines.

La especie B. cereus presenta variabilidad en cinco caracteres bioquímicos. Es de destacar que un 44,44% de las cepas no utilizan los citratos. Un 22,22% no producen ácido de sacarosa y 11,11% no poseen lecitinasa; datos que coinciden con Lemille (130). Hay tres cepas que pertenecen a la variedad albolactis y una a la variedad mycoides.

La especie B. circulans ha presentado variación en cinco caracteres bioquímicos; aunque estos caracteres han variado en un número muy pequeño de cepas.

La especie B.adius lo mismo que B. firmus y B. megaterium ha presentado una gran variabilidad respecto a los caracteres bioquímicos de la cepa tipo. Siendo de destacar que un 66,66% de las cepas no licuan la gelatina y no hidrolizan la caseína el 83,33%.

No destacamos las variaciones del resto de las especies porque se han aislado un número muy pequeño de cepas.

Las cepas de Bacillus con variaciones bioquímicas, aparecen en todas las formas farmacéuticas, no existiendo una relación entre un determinado mutante y la forma farmacéutica de donde han sido aisladas. Por lo que suponemos que estos mutantes se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y han llegado al medicamento a través de las materias primas, de las contaminaciones ambientales y del personal que interviene en el proceso de fabricación.

En la mayoría de las formas farmacéuticas se han encontrado una gran diversidad de especies del género Bacillus. El número de especies diferentes ha sido mayor en unas formas farmacéuticas que en otras, debido a que el grado de contaminación fue distinto y también porque algunas muestras presentaron altos recuentos. Teniendo en cuenta el número de muestras analizadas de cada forma farmacéutica, la mayor proporción de especies diferentes se encuentra en el extracto fluido, aunque se ha estudiado un bajo número de muestras. En el caso de los jarabes, que en general presentan una baja contaminación, hay que resaltar que se han encontrado 13 especies diferentes de Bacillus, esto se debe a que una de las muestras ha presentado un elevado recuento. En las soluciones que fue una de las formas farmacéuticas menos contaminadas, sólo han presentado 3 especies diferentes (tabla III-23).

Las especies del género Bacillus se han encontrado en diferente proporción, según la forma farmacéutica; estando presentes en todas ellas. La especie B. subtilis ha sido la más frecuente en comprimidos, grageas, cápsulas y extracto fluido. En cambio en los polvos la especie más frecuente ha sido el B. pumilus, y la de B. polymyxa. Esto está de acuerdo con los datos obtenidos por nosotros (144) en un estudio realizado en la misma forma farma-

céutica. Debido a la erosión del suelo por el agua de lluvia, las esporas de algunas especies de Bacillus es fácil encontrarlas en el agua utilizada en la industria farmacéutica (110). El Manual Bergey (37) considera que las esporas de B. pumilus son más frecuentes en el suelo que las de B. subtilis.

Es de destacar el caso de los jarabes, en los cuales ha predominado la especie de B. coagulans cuyas esporas son poco frecuentes en el suelo. Las condiciones más favorables para el desarrollo de la forma vegetativa es la presencia de un azúcar fermentable, un pH más bien ácido y una incubación a temperatura adecuada en aerobiosis o anaerobiosis, condiciones que se dan en la mayoría de estos preparados (37).

Otros contaminantes aislados de los medicamentos pertenecen al género Staphylococcus (24 cepas), Micrococcus (22 cepas) y Streptococcus (2 cepas).

Las cepas de Staphylococcus se han clasificado siguiendo el esquema de Kloos y Schleifer (118), en el cual están incluidas hasta diez especies distintas, de procedencia humana algunas de las cuales no están incluidas en el Manual Bergey (37). Respecto a las cepas de Staphylococcus, un 50% son S. epidermidis, que frecuentemente está en la piel humana. Las otras especies aisladas, S. capitis, S. cohnii y S. hominis, se encuentran también en piel humana. Estas especies es posible que procedan del personal que interviene en el proceso de elaboración de los medicamentos. Diversos autores (64) (107) (115) (144) han encontrado S. epidermidis en diferentes formas farmacéuticas (polvos, cápsulas, jarabes y comprimidos).

Algunas cepas de S. epidermidis presentan variaciones bioquímicas respecto a los caracteres descritos para la cepa tipo. Siendo de resaltar, las estirpes que han perdido el enzima fosfatasa (16,66%). Todas ellas han sido aisladas de formas farmacéuticas

sólidas, principalmente de comprimidos, polvos, grageas. Este microorganismo en los últimos veinte años ha pasado de ser considerado como saprofito a ser incluido entre los patógenos oportunistas por haber sido causa de diversas infecciones (133). Sin embargo Hirsch (107) lo incluye entre los microorganismos patógenos.

El problema de la identificación del género Staphylococcus ha sido ampliamente estudiado. Todos los autores están de acuerdo en considerar como microorganismos patógenos a los Staphylococcus coagulasa positiva. Lambin (127) ha señalado basándose en su experiencia, que el S. aureus después de ser inoculado a un jarabe, al cabo de un mes ha perdido parte de su actividad enzimática (coagulasa negativa y actividad fosfatásica débil), permaneciendo el enzima DNasa que es más resistente. Por este hecho consideran que es insuficiente la prueba de la coagulasa para definir el poder patógeno. Este hecho habría que tenerlo en cuenta en la investigación de estafilococos patógenos en los preparados farmacéuticos. También Lambin (127) comprobó que S. epidermidis había perdido el enzima fosfatasa. De los preparados estudiados, hemos aislado dos cepas (21ñ, 99d) de S. epidermidis fosfatasa negativa. La pérdida de esta enzima ha podido ser debida a la supervivencia de estas cepas en condiciones adversas.

Koupel y Deibel (122) observaron un alto grado de correlación entre la producción de coagulasa y la nucleasa termoestable, siendo esta un enzima constante producida por S. aureus. Así mismo hay una estrecha relación entre la producción de enterotoxina y la presencia de termonucleasa. Debido a la dificultad de demostrar la existencia de enterotoxina, en la práctica lo que se investiga es la actividad termonucleasa y solamente en el caso de que la cepa posea este enzima se estudiará la producción de enterotoxina. Por estas razones nosotros hemos incluido en la identificación de Staphylococcus la prueba de la termonucleasa.

Las especies de S. simulans, S. hominis y S. capitis han presentado variabilidad en la fermentación de algunos azúcares respecto a los caracteres descritos para las cepas tipo.

El número de cepas de Staphylococcus aisladas no ha sido alto, esto puede ser debido a que estos preparados son de elaboración industrial ya que otros autores (69) han encontrado valores más altos en preparados oficinales.

Es interesante señalar la importancia que para la investigación de S. aureus tiene el grado de selectividad del medio de cultivo, sobre todo cuando hay un pequeño número de células y están presentes en el producto otras bacterias en mayor número, que ejercen una competencia con ellas (Bacillus). Así en los medios que tradicionalmente son utilizados como medios selectivos para el aislamiento de S. aureus: Vogel-Johnson, Baird-Parker y Chapman se ha podido ver que en algunas ocasiones se desarrollan colonias de enterococos, con morfología muy similar al S. aureus. Para salvar este inconveniente será necesario siempre la realización del test de la catalasa (63). En algunos de estos medios selectivos que contienen lecitina, se pueden desarrollar especies de Bacillus cereus, que poseen el enzima lecitinasa; aunque el desarrollo de estos bacilos se puede suprimir por la adición al medio de azida de sodio que afecta al tamaño de la colonia pero no al número de células presentes (86) (134). La mayoría de los medios selectivos son aceptables para el recuento de células normales o salvajes, pero son tóxicos o inhibitorios para las células alteradas por agentes físicos o químicos (181).

La presencia de especies del género Micrococcus puede ser debida a que su habitat natural es el suelo, el aire y la piel de las personas y animales. Estas especies son frecuentemente pigmentadas y estos pigmentos las protegen de las radiaciones solares, siendo una de las causas por las que sobreviven en diversos ambientes. Las diferentes especies nunca han sido asociadas a procesos patológicos a pesar de sus semejanzas con el género Staphylococcus, pero estudios genéticos han demostrado que su composición de bases del ADN es diferente (34).

Las especies más frecuentes han sido M. roseus (40, 91%), que se encuentran en el polvo y M. luteus (36, 36%) cuyo habitat más normal es la piel humana. Hirsch (34) encontró Micrococcus en su estudio de

preparados líquidos. Sin embargo en nuestro estudio sólo estaban presentes en formas sólidas (comprimidos, grageas, cápsulas y polvos), siendo mayor el número de cepas en comprimidos y menor en cápsulas (tabla III-24).

En los preparados estudiados se han encontrado 2 cepas de Streptococcus identificándose como: S. faecium y S. uberis. Esta última especie no está relacionada con el grupo D. A pesar de que los enterococos crecen en presencia de azida de sodio al 0,2%, la cepa de enterococo no se ha aislado de este medio de enriquecimiento. El S. uberis se ha encontrado en cápsulas de gelatina dura y pensamos que, debido al hábitat de éste microorganismo, piel de animales, proceda de la gelatina empleada en la elaboración de esta forma farmacéutica.

Algunos autores (60) (107) (115) han encontrado presencia de enterococos en diferentes formas farmacéuticas, tanto en preparados sólidos como líquidos; pero siempre en un número muy bajo en relación a los otros contaminantes. Estos resultados son semejantes a los nuestros. Desvignes (60) encontró enterococos en los medicamentos que contenían componentes de origen vegetal, animal y de síntesis; este hecho está de acuerdo con nuestros resultados. Hirsch (107) señaló la importancia de la investigación de estos microorganismos. Además Mandel (133) indica que los estreptococos del grupo D pueden ser causantes de diferentes infecciones.

Respecto a la contaminación por hongos, se han encontrado 18 cepas, de las cuales 17 eran mohos y una levadura, posible Rhodotorula. El género Penicillium ha sido el más frecuentemente encontrado (38,88%), seguido de Cladosporium (27,77%), Aspergillus (22,22%), Cephalosporium (5,55%) y Rhodotorula (5,55%).

Los hongos son uno de los contaminantes más frecuentes en los preparados farmacéuticos, aunque Lambin (126) no detectó su presencia en comprimidos. Sin embargo otros autores los han encontrado en comprimidos (89) (132), polvos (144), jarabes (8) (127) y soluciones (107).

En nuestro estudio se han encontrado en todas las formas farmacéuticas.

La presencia de mayor % de Penicillium, puede ser debida a encontrarse frecuentemente en una de las materias primas más utilizadas en la industria farmacéutica, los almidones. Así Guarro (98) (99) en su estudio sobre la microflora fúngica de los almidones de uso farmacéutico, en la industria española, señala que hay un predominio de especies del género Penicillium sobre Aspergillus. Estos contaminantes se han denominado "hongos de almacenaje" puesto que su desarrollo se favorece por el almacenamiento de los cereales en grandes silos. Otro de los orígenes de la contaminación fúngica de estos preparados ha podido ser el aire de los locales de fabricación, ya que como indicaron Hugo y Russel (110) es frecuente en este tipo de ambientes la presencia de mohos como Penicillium, Aspergillus y Cladosporium y levaduras como Rhodotorula.

Los hongos se han considerado siempre como inocuos, a excepción de los que producen micosis profundas, sin embargo en la actualidad cada vez es más frecuente el número de procesos infecciosos en los que está implicado algún hongo.

En el caso de los productos farmacéuticos, tiene particular interés, la presencia de algunas especies del género Aspergillus, capaces de elaborar potentes aflatoxinas, cuya acción sobre la salud humana ha sido objeto de numerosos estudios (200). Respecto al género Penicillium, Guarro (101) ha señalado el poder tóxico de determinadas cepas: P. vetulium, P. aculeatum, P. citreo-viride y P. frequentans y el riesgo que representa la presencia de éstas, en los preparados farmacéuticos.

Si relacionamos los distintos tipos de contaminación en las formas farmacéuticas, vemos que todos los medicamentos estudiados han presentado Bacillus y hongos. Los preparados sólidos presentan una contaminación muy variable ya que también se han aislado en todos ellos Micrococcus, Staphylococcus y en algunos Streptococcus. No

ha sucedido lo mismo en los jarabes y soluciones, que sólo tenían Bacillus y hongos. La presencia solamente de formas esporuladas en estos preparados líquidos es debida a que estos microorganismos pueden soportar condiciones más adversas. A pesar de que las cifras de contaminación eran muy bajas en los jarabes, es interesante resaltar que ha sido la forma farmacéutica que ha presentado mayor proporción de muestras con hongos.

El número de microorganismos distintos que se han aislado de cada medicamento es muy variable; 5 medicamentos tenían un microorganismo contaminante, mientras que otros poseían de 2 a 21 distintos. Esto nos indica que la contaminación puede ser de un único origen o que procede de diversas fuentes.

Normativa propuesta.

Como hemos señalado anteriormente, no existen hasta el momento, en nuestro país, normas oficiales respecto a la calidad microbiológica de los preparados orales. Sin embargo Sancho (169), ha propuesto para estos preparados las mismas exigencias que para los alimentos envasados, en lo relativo al recuento microbiano, y ausencia de microorganismos patógenos. Nosotros consideramos que las exigencias microbiológicas para los medicamentos orales han de ser mucho más severas que las de los alimentos, ya que van destinados a personas con un proceso patológico cuyas defensas lógicamente están disminuidas y al que pueden sobreañadirse otro proceso patológico de tipo infeccioso. Dentro de este tipo de preparados hemos creído conveniente que los líquidos tengan mayores exigencias microbiológicas en el recuento de bacterias aerobias, que los sólidos, debido a que estos medicamentos, en general están destinados a afecciones del aparato respiratorio y con mayor frecuencia se administran a niños y personas de edad, que son más sensibles a las infecciones.

El proyecto de normativa que nos permitimos sugerir para este tipo de preparados es el siguiente:

I)- Ausencia de microorganismos patógenos como: Salmonella, Shigella, Ps.aeruginosa, S.aureus, y de indicadores de contaminación de origen fecal E.coli, S.faecalis y esporas de Clostridium sulfito reductores, por gramo o mililitro de medicamento.

II)-

- a) Cifra límite de bacterias aerobias viables y esporuladas saprofitas, para los preparados sólidos: menos de 1.000 por gramo.
- b) Cifra límite de bacterias aerobias viables y esporula-

das saprofitas, para los preparados líquidos: menos de 100 por mililitro.

- III)- Cifra límite de mohos y levaduras: menos de 100 por gramo o mililitro.

Consideramos necesaria la investigación de algunos microorganismos, como S. faecalis y esporas de Clostridium sulfito-reductores, cuya detección no se indica en la normativa de organismos oficiales y Farmacopeas. La importancia de su investigación ya ha sido comentada anteriormente.

Debido a que la misión de los medicamentos es restablecer el estado de salud, la cifra límite de bacterias aerobias saprofitas, tanto viables como esporuladas, no debe ser muy elevada. Aunque la FIP (84) fija una cifra límite máxima: 10.000 bacterias por gramo o mililitro, nosotros pensamos que estos preparados deben tener mejor calidad microbiológica. Apoya nuestra Tesis el hecho de que actualmente, y a pesar de no existir cifras límites oficiales, la mayoría de los medicamentos estudiados, fabricados en España, cumplen con la normativa propuesta, respecto a las bacterias aerobias. En lo referente a los mohos y levaduras estamos de acuerdo con la cifra propuesta por diversos autores (41) (94) (164) y FIP (82) (84).

Aunque las cifras límites de microorganismos las hemos referido por gramo o mililitro, consideramos necesario tener en cuenta la dosis terapéutica utilizada en cada medicamento. De acuerdo con Desvignes (60) sería adecuado introducir el concepto de dosis terapéutica para expresar los resultados del análisis microbiológico de los medicamentos no estériles.

V CONCLUSIONES

1). - El pH de los medicamentos se encuentra comprendido entre 2 y 9. La mayor proporción de muestras que presentan contaminación por bacterias aerobias corresponde a las que se encuentran en la zona alcalina (66,66%) y la menor en la zona ácida (40%).

2). - No se ha detectado ningún tipo de microorganismo en el 45,67% de las muestras estudiadas.

3). - El método más sensible para la detección del número de bacterias en estos preparados, tanto sólidos como líquidos, ha sido el del número más probable.

4). - Las formas farmacéuticas sólidas presentan una contaminación mayor que las líquidas. Las grageas han sido los preparados con mayor proporción de muestras con bacterias y los de menor las soluciones. Los jarabes son la forma farmacéutica con mayor proporción de muestras con hongos.

5). - La contaminación más frecuente en este tipo de medicamentos son las bacterias aerobias, y en menor proporción las bacterias anaerobias y los hongos.

6). - La contaminación microbiológica de las muestras de medicamentos ha sido poco elevada. Sólo el 3,08% presentan más de 10.000 bacterias aerobias y el 10,80% más de 1.000; el 3,70% más de 100 hongos por gramo o mililitro.

7). - En ninguna muestra se ha detectado presencia de los

siguientes microorganismos: E. coli, Salmonella, Shigella, Ps. aeruginosa, S. aureus, S. faecalis y bacterias anaerobias estrictas.

8). - Los microorganismos contaminantes presentes en los preparados, han sido por orden de frecuencia: Bacillus (35,18%), Staphylococcus (17,74%), hongos (14,81%), Micrococcus (12,03%) y Streptococcus (1,86%).

9). - Las 218 cepas del género Bacillus pertenecen a 19 especies, siendo por orden de frecuencia: B. subtilis, B. brevis, B. licheniformis, B. coagulans, B. pumilus, B. polymyxa, B. megaterium, B. firmus, B. cereus, B. circulans, B. badius, B. aneurinolyticus, B. pulvifaciens, B. freudenreichii, B. lentus, B. larvae, B. sphaericus, B. pantothenicus y B. alvei.

La especie B. subtilis se ha encontrado en todas las formas farmacéuticas, predominando B. coagulans en los jarabes.

10). - Las 24 cepas de Staphylococcus pertenecen a cinco especies, encontrándose por orden de frecuencia: S. epidermidis, S. simulans, S. hominis, S. cohnii y S. capitis.

11). - Las 22 cepas de Micrococcus pertenecen a tres especies, encontrándose por orden de frecuencia: M. roseus, M. luteus y M. varians.

12). - Las 2 cepas de Streptococcus son: S. uberis y S. faecium.

13). - Las 18 cepas de hongos pertenecen a cinco géneros siendo por orden de frecuencia: Penicillium, Cladosporium, Aspergillus, Cephalosporium y Rhodotorula.

14).- En los géneros Bacillus y Staphylococcus se han encontrado mutantes respecto a la cepa tipo. Sólo el 25,65% de las cepas del género Bacillus coinciden con las características descritas para la cepa tipo. Los caracteres bioquímicos que presentan mayor variación son: producción de ácido de lactosa y presencia de lecitinasa. Un 16,66% de las cepas de S.epidermidis no poseen fosfatasa.

Conclusión final: Basandonos en las anteriores conclusiones proponemos el siguiente proyecto de normativa, para los medicamentos de administración oral:

I)- Ausencia de microorganismos patógenos como: Salmonella, Shigella, Ps.aeruginosa, S.aureus e indicadores de contaminación fecal: E.coli, S.faecalis y esporas de Clostridium sulfito-reductores, por gramo o mililitro de medicamento.

II)- Cifra límite de bacterias aerobias viables y esporuladas, para los preparados sólidos, menos de 1.000 por gramo.

-Cifra límite de bacterias aerobias viables y esporuladas, para los preparados líquidos, menos de 100 por mililitro.

III)- Cifra límite de hongos, menos de 100 por gramo o mililitro.

R E S U M E N

En la actualidad, la investigación de la contaminación microbiológica de los preparados farmacéuticos no estériles, es un tema de primordial interés para la industria farmacéutica de todo el mundo por razones de tipo sanitario y económico.

Desde el punto de vista sanitario, la misión primordial del medicamento es restablecer la salud del paciente. Si estos medicamentos se encuentran contaminados por microorganismos, pueden desencadenar infecciones secundarias, en ocasiones, de mayor transcendencia que el propio padecimiento del individuo. Estos hechos se tomaron en consideración, a partir de 1958, como consecuencia de la administración de preparados farmacéuticos de vía oral y tópica que contenían microorganismos patógenos.

La producción a gran escala de los medicamentos puede suponer grandes pérdidas para la industria farmacéutica, si se origina una alteración de los caracteres organolépticos, de la estabilidad o de la actividad del medicamento, debido a la presencia de microorganismos.

Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de los preparados farmacéuticos de administración oral, ya que la mayor parte de los medicamentos se administran por esta vía, la más natural; además porque hay una gran variedad de formas farmacéuticas, que requieren distintos procesos tecnológicos los cuales pueden influir en su calidad microbiológica.

Se ha realizado el estudio microbiológico de este grupo de medicamentos, primero para aportar un mayor conocimiento del grado de contaminación, realizándose diferentes recuentos por diversos métodos microbiológicos, y en segundo lugar se han determinado cuales con los contaminantes más frecuentes en estos preparados.

De los resultados obtenidos se ha deducido que el 45,67% de las muestras no han presentado ningún tipo de contaminación y en general los valores obtenidos en los recuentos no eran elevados. Además ninguna muestra ha tenido presencia de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación fecal, así como de bacterias anaerobias estrictas. El método que ha detectado mayor número de muestras con presencia de microorganismos ha sido el del número más probable. La forma farmacéutica con mayor porcentaje de muestras contaminadas por bacterias ha sido las grageas y por hongos los jarabes. Los microorganismos encontrados en orden de frecuencia han sido: Bacillus, Staphylococcus, Micrococcus, hongos y Streptococcus.

Como conclusión final se ha propuesto una normativa para los medicamentos no estériles, de administración oral.

234

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- (1). - ABDOU, A. F. 1973. "In Pharmazentika unerwünschte mikroorganismen I. Pseudomonas aeruginosa: Bedeutung, Vorkommen, Nachweis und Bekämpfung". Pharm. Ind. 35 12, 857-868.
- (2). - AJELLO. 1975. "Advances in Mycology". Comunicación al Congreso Internacional de Japón en 1975.
- (3). - ALEXOPOULUS, C. J. 1962. "Introductory Mycology". 2^a Ed. John Wibajand. Sons Toppan. Pub. Co. Tokio.
- (4). - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1976. "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". Ed. Marvi L. Speck. Washington.
- (5). - ANONIMO. 1964. "Hospital infection with Pseudomonas aeruginosa". Brit. Med. J. II, 1019-1020.
- (6). - AYLIFFE, G. A. J. and LOWBURY, E. J. L. 1965. "Hospital infection with Pseudomonas aeruginosa in neurosurgery". The Lancet, 21, 365-369.
- (7). - AYLIFFE, G. A. J., BARRY, D. R., LOWBURY, E. J. L., ROOPER-HALL, M. J. and WALKER, W. M. 1966. The Lancet, 1, 1113.

- (8). - AZRIA, M. 1971. "Etude de la contamination microbienne de préparations pharmaceutiques appliqués aux sirops". Tesis Doctoral, serie U nº 491. Université René Descartes. Paris.
- (9). - BAIRD-PARKER, A. C. 1963. " A classification of Micrococci and Staphylococci on physiological and biochemical tests ". J. Gen. Microbial, 30, 409-427.
- (10). - BAIRD-PARKER, A. C. 1965. " The classification of Staphylococci and micrococci from world-wide source ". J. Gen. Microbial, 38, 363.
- (11). - BAIRD-PARKER, A. C. 1966. " Identification Methods for microbiologists." 1. " Methods for classifying Staphylococci and Micrococci ". 59-63. Ed. Academic Press. London and New York.
- (12). - BAIRD-PARKER, A. C., HILL, L. R., KLOOS, W. E., KOCUR, M., OEDING, P. and SCHLEIFER, K. H. 1976. " Identification of Staphylococci". Int. J. Syst. Bacteriol, 26, 3, 333-334.
- (13). - BAIRD-PARKER, R. M. and SHOOTER, R. A. 1976. " Pseudomonas aeruginosa infections associated with use of contaminated medicaments". Br. Med. J. 2, 349-350.
- (14). - BANWART, G. J. 1979. " Basic Food Microbiology". Ed. Avi. Westport, Connecticut.

- (15). - BARJAC, H. et BONNEFOI, A. 1972. " Essai de classification biochimique de 64 Bacillus des groupes II et III représentant 11 espèces différentes". Ann. Inst. Pasteur, 122, 463-473.
- (16). - BARNETT, H.L. and HUNTER, B.B. 1972. " Illustrated genera of imperfect fungi". 3rd edition. Ed. Burgess, Minneapolis, Minnesota.
- (17). - BAZEL, R. J. 1971. Science, 172, 41.
- (18). - BEAN, H. S., BECKETT, AM. M. and CHARLESS, J.E. 1964. " Advances in Pharmaceutical sciences". Ed. Academic Press I, London.
- (19). - BEAN, H. S. 1967. "The microbiology of topical preparations in pharmaceutical practice. 2. Pharmaceutical aspects". Pharm. J. 199, 289-292.
- (20). - BEAN, H. S. 1967. "La préservation des produits pharmaceutiques contre la contamination microbienne". Ann. Pharm. Frç. 25, 4, 265-270.
- (21). - BEAN, H. S. and FARREL, R. C. 1967. "The persistence of Pseudomonas aeruginosa in aqueous solutions of fenols". J. Pharm. Pharmacol. 19, 183_S-188_S.
- (22). - BEAN, H. S., B Pharm. Ph D. and F D.S. 1967. "2 Pharmaceutical aspects". Pharm. J. 23, September, 289-292.

- (23) .- BEAN, H. S. 1967. "British Pharmaceutical conference".
Pharm. J. 2, 289.
- (24) .- BEAN, H. S. 1973. "Agents de conservation des préparations
pharmaceutiques". Pharm. Internation. 5, 31-38.
- (25) .- BEVERIDGE, E. G., BPhar, PhD, MPS and HOPE, I. A.
1971. "Microbial content of pharmaceutical solutions".
Pharm. J. July 31, 102-103.
- (26) .- BEYS-L'HOEST, B. 1970. "La recherche des saprophytes
dans les aliments, les produits diététiques et les médi-
caments á usage oral". J. Pharm. Belg. 25, 1, 26-56.
- (27) .- BICKEL, VONH und MEYER, K. H. 1980. "Mikrobiologische
prüfung des wassers im rahmen der inprozeB-Kontro-
llen", Pharm. Ind. 42, 3, 285-290.
- (28) .- BOLETIN OFICIAL ESTADO. 1963. Decreto 2464/1963. 7
octubre.
- (29) .- BOLETIN OFICIAL ESTADO. 1976. Decreto 23406/1976. 19
noviembre.
- (30) .- BRENNAN, E. C. and col. 1968. "Bacteriological Purity: A
consideration in the manufacture and packaging of phar-
maceuticals". Am. J. Hosp. Pharm. 25, 302.
- (31) .- BROWN, M. R., FOSTER, J. M. and NORTON, D. A. 1965.
"Infections diseases. Infections at Birmingham and
Midlands Eye Hospital Infections diseases and vital
statistics". Brit. Med. J. 11. 1316.

- (32). - BRITISH PHARMACOPOEIA. 1973. Her Majesty's Stationery Office. London.
- (33). - BRITISH PHARMACOPOEIA. 1980. Published on the recommendation of the Medicines Commission. Ed. Her Majesty's Stationery Office. London.
- (34). - BROCK, T.D. 1979. "Biology of microorganisms". 3rd. edition. Ed. Pentice-Hall. New Jersey.
- (35). - BRUCH, C.W. 1972. "Possible modifications of USP. Microbial limits and tests". Drug. Cosmetc. Ind. june, 32-38 y 116-121.
- (36). - BRUCH, C.W. 1972. "Objectionable micro-organisms in non-sterile drugs and cosmetics". Drug Cosmetic. Ind. october, 51-54 y 150-156.
- (37). - BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E. 1974. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8th. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore.
- (38). - BÜHLMANN, X. 1968. "Method for microbiological testing of non-sterile pharmaceuticals". Appl. microbiol. 16, 12, 1919-1923.
- (39). - BÜHLMANN, X. 1969. "Manufacturing hygienne in the Swiss drug industry: Comptemporary aspects and recent treds. Svensk farmaceutisk T. 73, 873-886.
- (40). - BÜLMANN, X. 1971. "Microbiological control in the manufacture of sterile pharmaceutical products". Pharm. Acta-Helv. 46, 385-409.

- (41). - BÜHLMANN, X., GAY, M., GUBLER, H. U., HESS, H., KABAY, A., KNÜSEL, F., SACKMAN, W. SCHILLER, I. and URBAN; S. 1972. "Microbiological quality of pharmaceutical preparations". Am. J. of Pharm. 144, 165-185.
- (42). - BÜHLMANN, X., JÄKEL, D., BOUSKA, T., GAY, M., HECHER, W., SCHILLER, J., DALLATORRE, M., FELS, P, and GASCHEN, D. 1977. "Zur antimikrobiellen Behandlung pharmazeutischer ausgaugsstaffe". Pharm. Ind. 39, 8, 815-818.
- (43). - BUOGO, A. et RATTI, L. 1972. "La surveillance de la pollution microbienne de l'air dans une usine pharmaceutique". J. Mond. Pharm. 2, 15, 102-111.
- (44). - BUOGO, A. and RATTI, L. 1972. "Method for the microbiological control of non-sterile drugs". Il Farmaco, 27, 523-531.
- (45). - BUTTIAUX, R. et MOSSEL, D.A. 1957. Annl. Inst. Pasteur, Lille IX, 138.
- (46). - BUTTIAUX, R., BEERENS, H. et TACQUET, A. 1974. "Manual de technique bacteriologiques". 4^e edition. Ed. Flammarion Médecine sciences. Paris.
- (47). - CARTWRIGHT LORNA, G. 1976. "A study of fugal contaminants in pharmaceutical raw materials". Tesis Doctoral. Universidad de Sydney.

- (48). - CATALOGO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS. 1980.
Publicación del Consejo General de Colegios de Farmacéuticos. Madrid.
- (49). - CLAUSEN, O. G. 1957. "Undersøkelse av noen Kjemiske forbindelsers antimikrobielle effekt". Universitetsforlaget, Oslo University Press, 80, Oslo.
- (50). - CLAUSEN, O. G. 1972. "Microorganisms isolated drugs of fluid medicaments". Pharm. Acta-Helv. 48, 622-627.
- (51). - CODIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL. 1967. (B. O. E. 20-10-67, Cap. XXVII; sección 1ª Aguas y Hielo).
- (52). - COMITTE ON CONTINUING EDUCATION. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 1978. "Identification of saprophytic fungi commonly encountered in a clinical environment". 78th annual meeting. Las Vegas. Nevada.
- (53). - CONANT, N. F., SMITH, D. T. BAKER, R. D. y CALLAWAY, J. L. 1971. "Micologia". Ed. Interamericana. México.
- (54). - COSATTE, M. R. 1972. Commission travail parisiennes de la Société de Technique Pharmaceutique. "Qualité microbiologique des médicaments". Sci. Techn. pharm. T₁, 2. 95-99.
- (55). - COWAN, S. T. and STEEL. 1974. "Manual for the Identification of medical bacteria". Second edition. Cambridge University press.

- (56). - CURRAN, H. R. and EVANS, F. R. 1943. "The accelerating effect of sublethal heat on spore germination in mesophilic aerobic bacteria". J. Bact., 46, 513.
- (57). - CZAKIS, P. 1971. "Good manufacturing practises and other fallacies". J. Mond. Pharm., 3, 14, 215-219.
- (58). - CHRISTENSEN, C. M. 1969. "Influence of moisture content, temperature and time of storage upon invasion of rough rice by storage fungi". Phitopathology, 59, 145-148
- (59). - DAVIS, J. G., D. Sc., Ph. D., F. R. I. C., M. I. B. and F. R. S. H. 1960. "Chemical sterilization". J. Mond. Pharm. 12, 29T-40T.
- (60). - DESVIGNES, A., SÉBASTIEN, F., BERNARD, J. et CAMPION, G. 1973. " Étude de la contamination microbienne de diverses préparations pharmaceutiques". Ann. Pharm. Fraç., 34, 12, 775-785.
- (61). - DESVIGNES, A., BERNARD, J., SÉBASTIEN, F. et FROTTIER, M. 1974. "Étude de quelques agents conservateurs. Contrôle de leur efficacité antimicrobienne dans une préparation émulsionnée". Ann. Pharm. Fraç. 32, 1, 37-52.
- (62). - DEUTCHES ARNEIBUCH. 1968. D. A. B. 7. Augabe Deutcher Apotheker-Verlag Stuttgart.
- (63). - DEVLEESCHOUWER, M. J, et CORNIL, M. F., et DONY, J. 1978. "Commentaires concernant la recherche de Staphylococcus aureus dans les médicaments". J. Pharm. Belg. 33, 5, 325-328.

- (64). - DEVLEESCHOUWER, M.J. et DONY, J. 1979. "Flore microbienne des médicaments données écologiques et sensibilité aux antibiotiques". 1^a partie: Formes magistrales sèches. J. Pharm. Belg. 34, 4, 189-203.
- (65). - DEVLEESCHOUWER, M.J. et DONY, J. 1979. "Normes microbiologiques des drogues d'origine végétale et leurs mélanges". J. Pharm. Belg. 34, 5, 260-266.
- (66). - DONY, J. et GERARD, P. 1968. "La contamination microbienne des médicaments abaissement de normes de qualité bactériologique". J. Mond. Pharm. 1, 11, 19-32.
- (67). - DONY, J. 1969. "Condition microbiologique du médicament non stérile". Compte rendu Symposium XIX^{es} Journées Pharm. Internat. de Paris Moniteur des pharm. et des Lab. 23, 8, 75-79.
- (68). - DONY, J. 1976. "Microbiologie du médicament". Bull. et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belg. 131, 323-335.
- (69). - DONY, J. 1977. "La qualité microbiologique des médicaments, matières et produits terminés". Labo-Pharma., Problèmes et techniques, 265, 113-121.
- (70). - EDITORIAL. 1971. "Microbial content of medicines". Pharm. J. July 31, 91-92.

- (71). - ERNEFELDT, F. 1963. "Tablets and tablet-making from the bacteriological point of view". Fédération Internationale Pharmaceutique (FIP) Commission des Directeurs de Laboratoires de Contrôle-Helsinki.
- (72). - EUROPEAN PHARMACOPEIA. 1975. Committe documents PA/PH/Exp. 1CM.(75) 2 of april 4.
- (73). - EVANS, J. R., GILDEN, M. M. and BRUCH, C, W. J. 1972. Cosmet. Chem. 23 ang.
- (74). - EVANS, J. R. and KLOOS, W. 1972. "Use of snake cultures in a semisolid Thioglycolate medium for differentiating Staphylococci from Micrococci". Appl. Microbiol. 23, 2, 326-331.
- (75). - FARMACOPEA INTERNACIONAL. 1972. Segunda edición suplemento 1971. "Especificaciones para la inspección de la calidad de los preparados farmacéuticos". Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- (76). - FARMACOPEA OFICIAL ESPAÑOLA. 1954. IX^a edición. Real Academia de Medicina. Madrid.
- (77). - FARMACOPEIA PORTUGUESA. 1961. IV^a edição. Imprensa Nacional. Lisboa.
- (78). - FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALINA. 1972. VIII^a edición. Tomo I. "Norme per buona fabbricazione e per il controllo di qualità dei medicinali". 1-12. Ed. Istituto poligrafico della stato.Roma.

- (79). - FABERO, M. S., CARSON, L. A., BOND, W. W. and PETERSEN, N. I. 1971. "Pseudomonas aeruginosa: growth in distilled water from hospitals". *Sciences*, 173, 836-838.
- (80). - FOOD and DRUG ADMINISTRATION. 1971. "Good manufacturing practices regulations, 15.1.71, revised edition 2.3.71. "The Gold Sheet" special edition january. *Pharm. Ind.* 33, 364-369.
- (81). - FEDERATION INTERNATIONALE PHARMACEUTIQUE (FIP). 1970. Rapport Section des Pharmaciens de l'Industrie et Commissions des Directeurs de Laboratoires de Contrôle. "Règles de bonne fabrication". *J. Mond. Pharm.* 13, 147-153.
- (82). - FEDERATION INTERNATIONALE PHARMACEUTIQUE (FIP). 1972. Rapport commun du comité des laboratoires et services officiels de contrôle des médicaments et de la Section des Pharmaciens de l'industrie. "Pureté microbiologique des formes pharmaceutiques non obligatoirement stériles". *J. Pharm. Belg.* 27, 6, 670-682.
- (83). - FEDERATION INTERNATIONALE PHARMACEUTIQUE (FIP). 1975. Comité des laboratoires et services officiels de contrôle des médicaments et Section des Pharmaciens de l'Industrie. "Méthodes suggérées pour la numération des germes vivants (aérobies, aérobies-anaérobies facultatifs) dans des préparations non obligatoirement stériles (produits de base et produits finis). *Sci. Techn. Pharm.* T 4. 4.

- (84). - FEDERATION INTERNATIONALE PHARMACEUTIQUE (FIP).
1976. Second joint rapport of the comité of official
laboratories and drug control services, and the Sec-
tion of Industrial Pharmaciets. "Microbiological pu-
rity of non-compulsorily sterile pharmaceutical pre-
parations methods of examination". Pharm. Acta-
Helv. 51, 3, 33-49.
- (85). - FISCHER, A. ; FUGLSANG-SMIDT, B. and ULRICH, K. 1968.
"Microbial content in non-sterile pharmaceuticals".
Dansk Tidsskr. Pharm. 42, 125-131.
- (86). - FLOWERS, R. S. , MARTIN, S. E. , BREWER, D. G. and
ORDAL, Z. J. 1976. "Catalase and enumeration of
stressed Staphylococcus aureus cells". 33, 1112-
1117.
- (87). - FRANCH, P. 1970. "Rezeptmäßige herstellung mikrobiell
nicht verunreinigter augentropfenlösungen und augen-
salben". Pharm. Acta-Helv. 45, 329-344.
- (88). - FUGLSANG-SMIDT, B. and ULRICH, K. 1968. Dansk.
Tdsskr. Farm. 42, 257.
- (89). - GALLIEN, R. 1972. "Mikrobielle kontamination von fertig-
produkten und rohstoffen. Problematik, ergebnisse,
schlußfolgerungen". Pharm. Ind. 34, 929-932.
- (90). - GASCHEN, M. 1974. "Hygiène et fabrication de médicaments".
Pharm. Acta-Helv. 49, 7/8, 261-265.

- (91). - GASTON DE IRIARTE, E. 1958. "Control microbiológico de medicamentos". Galénica Acta, 1, 11, 31-49.
- (92). - GASTON DE IRIARTE, E. 1975. "Plásticos en Farmacia". Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia, 6 febrero 1975. Real Academia de Farmacia. Madrid.
- (93). - GASTON DE IRIARTE, E. 1975. "Microbiología, Técnicas, Controles y Análisis Clínicos". Ed. Augusta. Barcelona.
- (94). - GAY, M. 1969. "Contamination microbienne des médicaments non stériles". Document du travail pour une séance a l'OMS.
- (95). - GLOMOT, R. 1980. "Bonnes pratiques de laboratoire (G. L. P.). Approches actuelles aux plans européen et mondial". Sci. Techn. Pharm. T. 9,3, 115-121.
- (96). - GORDON, R. E., HYDE, J. L. and MOORE, J. A. 1977. "Bacillus firmus-Bacillus lentus: a series or one species?". Int. J. of System Bact. 27: 256-262.
- (97). - GRIGO, J. 1975. "Vorschriften der USP XIX für deu mikrobiologischen Limit-Test". Pharm. Ind. 37, 4, 268-271.
- (98). - GUARRO, J., CALVO, M^a A. y SUAREZ, G. 1978. "Los hongos como contaminantes en la industria farmacéutica I". Circ. Farni. XXXVI, 261, 260.

- (99).- GUARRO, J., CALVO, M^a A. y SUAREZ, G. 1979. "Los hongos como contaminantes en la industria farmacéutica II. Género Aspergillus". Circ. Farm. XXXVII, 262, 5.
- (100).- GUARRO, J., CALVO, M^a A. y SUAREZ, G. 1979. "Los hongos como contaminantes en la industria farmacéutica III. Género Penicillium". Circ. Farm. XXXVII. 263, 149.
- (101).- GUARRO, J., CALVO, M^a A. y SUAREZ, G. 1979. "Los hongos como contaminantes en la industria farmacéutica IV. Estudio toxicológico de 60 cepas aisladas de excipientes". Circ. Farm. XXXVII. 264, 289.
- (102).- GUINEA, J., SANCHO, J. y PARES, R. 1979. "Análisis microbiológico de aguas. Aspectos aplicados". Ed. Omega. Barcelona.
- (103).- HARRIGAN, W. F. y McCANCE, M. E. 1968. "Métodos de laboratorio en Microbiología". Ed. Academia. León.
- (104).- HECKER, W. M., HEINTZ, T., BÜHLMANN, X. and GAY, M. 1976. "Isolation and differentiation of clinically important Pseudomonas species in the microbiological testing of pharmaceutical products". Pharm. Ind. 38, 373-378
- (105).- HESS, H., KNÜSEL, F. and MULLEN, K. 1969. "Control of low level microbial contamination of drug preparations". Pharm. Acta-Helv. 44, 174-200.

- (106). - HESS, H.K. 1970. "Personelle Hygiene bei der herstellung pharmazentischer präparate". Pharm. Ind. 32, 1019-1024.
- (107). - HIRCH, J.I., CANADA, A. T. and RANDALL, E. L. 1969. "Microbial contamination of oral liquid medications". Am. J. of Hosp. Pharm. 26, 626-629.
- (108). - HITOKO, H., MOROZUNII, S., WANKE, T., SAKAL, S. and KURATA, H. 1978. "Fungal contamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs". Appl. Envir. Microb. 36, 2, 252-256.
- (109). - HUGO, W. B. and FASTER, J. H. S. 1964. "Growth of Pseudomonas aeruginosa in solutions of esters of p-hydroxybenzoic acid". J. Pharm. Pharmacol. 16, 209-210.
- (110). - HUGO, W. B. and RUSSEL, A. D. 1977. "Pharmaceutical Microbiology". Ed. Blackwell scientific publications. Oxford.
- (111). - HUISMAN, J. and DANIELS-BOSMAN, H. S. 1962. "Salmonella contamination of an organ preparation (pancreatin)". Nederl. T. Geneesk. 106. 371.
- (112). - INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 1976. Subcommittee on de Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 3, 332-334.
- (113). - JAMINET, F. 1969. Cercle Scientifique des anciens élèves de l'Institut A. Gilkinet, Liège, Journée scientifique du 16 mars.

- (114). - JORNADAS DE LA ASOCIACION ESPAÑOLA DE FARMACEUTICOS DE LA INDUSTRIA ...1978. "Normas básicas para la fabricación y la inspección de la calidad de los medicamentos". Actas oficiales de la OMS nº 226, 1975-anexo 12. Madrid, diciembre 1978.
- (115). - KALLINGS, L.O., RINGERTZ, O., SILVERSTOLPE, L. and ERNERFELDT, F. 1966. "Microbiological contamination of medical preparation". Acta Pharm. Suecica. 3, 219-228.
- (116). - KALLINGS, L.O. 1968. "Good manufacturing procedures and microbiological control for non-sterile drugs". SIM special publication nº4. Proceedings of the Society for Industrial Microbiology, Summer Institute, 19-27 may 1968. University of Maryland, College Park.
- (117). - KING, E.O., WARD, M.K. and RANEY, D.E. 1954. "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein". J. Lab. Clin. Med. 44, 301-307.
- (118). - KLOOS, W.E. and SCHLEIFER, K.H. 1975. "Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species". J. of Clin. Microb. 1, 1, 82-88.
- (119). - KLOOS, W.E. and SCHLEIFER, K.H. 1975. "Isolation and characterization of Staphylococci from human skin . II Description of four new species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis, Staphylococcus simulans". Inter. J. of Syst. Bact. 25, 1, 62-79..

- (120). - KLOOS, W. E., TORNABENE, T. G. and SCHLEIFER, K. L.
1974. "Isolation and characterization of Micrococci from
humain skin, including two new species: Micrococcus
lylae, and Micrococcus kristinae". Inter. J. of Syst. Bact.
24, 1, 79-101.
- (121). - KOMARMY, L. E., OXLEY, M. E. and BRECHER, G. 1967. "Hos-
pital acquired salmonellosis traced to carmine dye capsu-
les". New. Engl. J. Med. 276, 350
- (122). - KOUPAL, A. and DEIBEL, R. H. 1978. "Rapid qualitative me-
thod for detecting staphylococcal nuclease in food". Appl.
and Env. Microbiol. 35, 6, 1193-1197.
- (123). - LACHICA, R. V. F., GENIGEORGIS, G. and HOEPRICH, P. D.
1971. "Metachromatic agar-diffusion methods for detec-
ting staphylococcal nuclease activity". Appl. Microbiol.
21, 585-587.
- (124). - LACHICA, R. V. F., HOEPRICH, P. D. and GENIGEORGIS, G.
1971. "Nuclease production and lysostaphin susceptibility
of Staphylococcus aureus and other catalase-positive cocci".
Appl. Microbiol. 21, 823-826.
- (125). - LAGODSKY, H. 1971. "Mesure de la contamination microbien-
ne de l'air comme facteur d'environnement de la produc-
tion pharmaceutique". J. Mond. Pharm. 1-2, 14, 47-51.
- (126). - LAMBIN, S. et JANOT, M. 1953. "Examen bactériologique des
comprimés pharmaceutiques". Ann. Pharm. Frç. 11,
9-10, 620-637.

- (127). - LAMBIN, S., DESVIGNES, A., KIGER, J.D. et AZRIA, M.
1972. "Étude de la contamination microbienne des sirops
pharmaceutiques". Ann. Pharm. Frç. 30, 3, 161-168.
- (128). - LANG, D.J., KUNZ, L.J., MARTIN, A.R., SCHRÖDER, S.A.
and THOMSON, L.A. 1967. "Carmines as a source of noso-
comial salmonellosis". New. Engl. J. Med. 276, 829-832
- (129). - LANGERON, M. et VANBREUSEGHENI, R. 1952. "Précis de My-
cologie". Ed. Mason. Paris:
- (130). - LEMILLE, F., de BARJAC, H. et BONNEFOI, A. 1968. "Essai
sur la classification biochimique de 97 Bacillus du grou-
pe I, appartenant à 9 espèces différentes". Ann. Inst.
Pasteur. 808-819.
- (131). - LEUNINGTON, K.R. 1967. "Salmonella in drugs and dietary
supplements". Drug. Cosmetic. Ind. 100, 42-43.
- (132). - LUDVA, J. 1964. "Mikrobiologicka kontrola tablet". Ceslolo-
farm. 13, 256-258..
- (133). - MANDELL, G.L., DOUGLAS, R.G. and BENNETT, J.E. 1979.
"Principles and practice of infectious diseases". Ed. Wi-
ley-Medical. New York.
- (134). - MARTIN, S.E., FLOWERS, R.S. and ORDAL, Z.J. 1976. "Ca-
talase: its effects on microbial enumeration". Appl. En-
viron. Microbial. 32, 731-734.
- (135). - MATSUSHIMA, T., ITOT, H. and IKEDA, M. 1957. "Investiga-
tion on the fungal spoilage of crude drugs. 1.". J. Jpn. Bot.
32, 9-15.

- (136). - MATSUSHIMA, T., ITOH, H. and IKEDA, M. 1958. "Investigation on the fungal spoilage drugs. 2." *J. Jpn. Bot.* 33, 12-23.
- (137). - MAURON, D. 1951. "Examen bactériologique des comprimés pharmaceutiques". Thèse doct. Univ. Phar. Paris, 7 juillet 1951, manuscrit 174 p.
- (138). - McBRIDE, M. E., DUNCAN, W. Ch. and KNOX, J. M. 1977. "The environment and the microbial ecology of human skin". *Appl. Envir. Microb.* 33, 3, 603-608.
- (139). - MEYER, H. 1964. "Ergebnisse der prüfung von flüssingen arzneizubereitungen aus apotheken auf ihren mikroorganismenbefall". *Pharm. Beil.* 19, 93-95.
- (140). - MILLER, W. S. and KORCZYNSKI, M. S. 1972. "Microbiological controls in packaging". *Drug Cosmetic. Ind.* June, 38-43 y 111-116
- (141). - MILLET, M., DONY, J. et GERARD, P. 1965. "Problèmes posés par la présence de germes dans les médicaments non injectables". *J. Pharm. Belg.* 120, 11, 12, 467-474.
- (142). - MITCHELL, R. G., OXON, B. M. and M. R. C. P. E. 1966. "Postoperative urinary-tract infections caused by contaminated irrigating fluid". *The Lancet*, April 9, 793-795.
- (143). - MOSSEL, D. A., BECHET, J. et LAMBION, R. 1962. "La prévention des infections et des toxi-infections alimentaires". Coop. Ed. Industries Alimentaire, Ceria, Bruxelles.

- (144). - MOSSO, M^a A., GARCIA, M^a L., FRESNO, A. y FERNANDEZ, R. 1977. "Contaminación microbiana de formas farmacéuticas alcalinas y su control por medios químicos". Anales de la Real Academia de Farmacia. 43, 4, 573-593.
- (145). - NATIONAL BOARD OF HEALTH SWEDEN. 1965. "Microbiological contamination of medical preparation". Repport 1965.
- (146). - NATIONAL FORMULARY. 1975. XIV^e. American Pharmaceutical Association. Washington.
- (147). - NATIONAL FORMULARY. 1980. XV^e. United States Pharmacopieal Convention. Inc. Rockville Md.
- (148). - NATIONAL HEALTH SERVICE LABORATORIES IN DENMARK. 1967. "Microbial content in non-sterile pharmaceuticals". Dansk. Tidsskr. Farm. 42, 1-4.
- (149). - NOBEL, W. C. and SAVIN, J. A. 1966. "Steroid cream contaminated with Pseudomonas aeruginosa". The Lancet. feb. 12, 347-351.
- (150). - NOGUEIRA, L. CORREIA, A. 1973. "Técnica farmacêutica e farmácia Galénica". II vol. Ed. Fundação calouste gulbenkian. Lisboa.
- (151). - ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1969. "Draft requirement for good manufacturing in the manufacture and quality control of drugs and pharmaceutical specialities". Technical Rapport Series nr. 418, annex 2.

- (152). - ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1969. "Comité d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques". 22^e Rapport O.M.S. Sér. Rapp. Techn. 418
- (153). - ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1969. "Inspección de la calidad de los medicamentos". Resolución adoptada por la 22^a asamblea mundial de la salud, Ginebra, diciembre.
- (154). - ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1972. 24^o informe del comité de expertos de la O. M. S. para las preparaciones farmacéuticas. Serie de informes técnicos nº 487.
- (155). - ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1975. "Comité de Expertos de la O. M. S. en especificaciones para los preparados farmacéuticos, vigésimo quinto informe".
- (156). - ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1977. "Comité de Expertos de la O. M. S. en especificaciones para los preparados farmacéuticos, vigésimo sexto informe".
- (157). - PEDERSEN, E. A. and ULRICH, K. 1968. "Microbial content in non-sterile pharmaceuticals. III Raw materials". Dansk. T. Farm. 42, 71-83.
- (158). - PENSO, G. 1969. Mémoire présenté aux Journées Pharmaceutiques Françaises.
- (159). - PHARMOCOPEE EUROPEENNE. 1969-1971-1977. Tomo I, II, III. Conseil de l'Europe. Maastricht. France.

- (160). - PHARMACOPÉE FRANÇAISE. 1972. IX^e édition. Ministère de la Santé Publique et de la Sécurité Sociale. Ed. Direction de la Commission Nationale de la Pharmacopée par l'ordre National des Pharmaciens. Paris.
- (161). - PHARMACOPEA HELVETICA. 1971. VI^e édition. Ed. Office Central Fédéral des Imprimeries et du Matériel. Berne.
- (162). - PHARMACOPEE INTERNATIONALE. 1969. XXII^e. Ed. O. M. S. Genève.
- (163). - PLOTKIN, S.A. and ANTRIAN, R. 1958. "Bacteremia caused by Pseudomonas sp. following the use of materials stored in solutions of a cationic surface-active agent". Amer. J. Med. Sci. 235, 621.
- (164). - RAFOLS, J. 1972. "Pureza microbiológica/proposición para establecer límites que permiten controlar el grado de contaminación microbiológica de los medicamentos". 1^a Jornadas Nacionales de la Dirección General de Sanidad. Laboratorios Farmacéuticos.
- (165). - RAMOS CORMENZANA, G, 1979. "Taxonomía Bacteriana". Ed. Secretariado de publicaciones de la Universidad de Granada.
- (166). - REPORT BY PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE WORKING PARTY. 1971. "Microbial contamination of medicines administered to hospital patients". The Pharm. J. July 31, 96-99.

- (167). - ROBINSON, E. P. 1971. "Pseudomonas aeruginosa contamination of liquid antacids: a survey". J. of Pharm. Sci. 60, 4, 604-605.
- (168). - ROMEND, C. 1977. "Aspect technologique des contrôles microbiologiques des médicaments des aliments et des cosmétiques". Labo-Pharm. Problem s et Techniques. 267, 543-547.
- (169). - SANCHO, J. GUINEA, J y PARES, R. 1980. "Microbiología analítica básica". Ed. Jims. Barcelona.
- (170). - SAUNDER, A. P. 1969. Paper presented at the 116th annual meeting of Am. Pharm, Assoc. Montreal, may 17-23.
- (171). - SAVIN, J.A. 1967. "The microbiology of topical preparations in pharmaceutical practice, 1. Clinical aspects". Pharm. J. 199, 285-288.
- (172). - SCHELIN, R. R. 1968. "Drug metabolism by intestinal microorganisms". J. Pharm. Sci. 12, 2021-2037.
- (173). - SCHLEIFER, K. H. and KLOOS, W. E. 1975. "A simple test system for the separation of Staphylococci from Micrococci". J. of Clin. Microb. 1, 3, 337-338.
- (174). -SCHLEIFER, K. H. and KLOOS, W. E. 1975. "Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus and descriptions of three new species: Staphylococcus cohnii, Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus xylosus". Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 1, 50-61

- (175). - SCHMID, H.W. 1976. "The quality control of medicines". Microbiological aspects in the control of non-sterile products". Ed. Elsevier Scientific. Amsterdam.
- (176). - SEVITT, S., M.A., M.D., M.Sc.Dubl., M.R.C.P.I. and D. P.H. 1949. "Source of two hospital-infected cases of tetanus". The Lancet, 10, 1075-1078.
- (177). - SHILLER, I., KUNTSCHER, H., WOLFF, A. and NEKOLA, M. 1968. "Microbial content of non-sterile therapeutic agents containing natural or seminatural active ingredients". Appl. Microbiol. 16, 12, 1924-1928.
- (178). - SMITH, N.R., GORDON, R.E. and CLARK, F.E. 1952. "Aerobic sporeforming bacteria". Agriculture monograph nº16. U.S. Dept. of Agric. Washington.
- (179). - SMITH, G. 1963. "Introducción a la micología industrial". Ed. Acribia. Zaragoza.
- (180). - SUAREZ FERNANDEZ, G. and YLLA-CATALA, M. 1979. "The formation of aflatoxins in different types of starches for pharmaceutical use". Pharm. Acta-Helv. 54, 3, 78-81.
- (181). - SUAREZ FERNANDEZ, G. and ARAQUISTAIN VALLE, I. 1980. "Comparative study of selective media to enumerate normal and stressed Staphylococcus aureus cells". Zentralblatt (aceptada su publicación).
- (182) - SWEDISH NATIONAL BOARD OF HEALTH. 1967. "Production hygiene and bacteriological control in the manufacture of pharmaceuticals". nr. 115. Stockholm.

- (183). - SYKES, G. 1971. "The control of microbial contamination in pharmaceutical products for oral and topical use-raw materials". J. Mond. Pharm. 1-2, 14, 8-20.
- (184). - SYLVAN, H. and NEWBURGER, Ph.D. 1962. "A manual of cosmetic analysis". Ed. Association of official analytical chemists. Washington.
- (185). - TAXONERA. 1976. I Seminario de Aspectos básicos actuales de la industria farmacéutica. "Normas correctas de fabricación y control de la calidad de los medicamentos". Ciencia Industria Farmacéutica. 8, 8, 218-227
- (186). - UDAGAW, S. KURATA, H., NARIZUKI, K., TAKATORI, K., NAKAO, M. and TAKAHASHI, K. 1976. "Distribution of aflatoxin-producing fungi in crude drugs of plant origin". Proc. Jpn. Assoc. Micotoxical. 3/4, 35-37.
- (187). - UNION COORDINADORA DE INDUSTRIAS FARMACEUTICAS. 1978. Subdirección General de Establecimientos y Asistencia Farmacéutica. "Normas para la fabricación y el control de calidad de los medicamentos". Madrid.
- (188). - UNITED STATES PHARMACOPEIA... XVIII. 1970. The United States Pharmacopeial. Convention inc. Bethesda Md.
- (189). - UNITED STATES PHARMACOPEIA. XIX. 1975. The United States Pharmacopeial. Convention inc. Rockville Md.
- (190). - UNITED STATES PHARMACOPEIA. XX. 1980. The United States Pharmacopeial. Convention inc. Rockville Md.

- (191). - WALLHÄUBER, H.K. 1970. "Die microbille reinheit von arzneimitteln in abhängigkeit von rohstoffen, herstellungsverfahren und verpackung." Pharm. Ind. 32, 1031-1040.
- (192). - WALLHÄUBER, K.H. 1972. "Die mikrobielle reinheit von nicht sterileu arzneimitteln". Pharm. Ind. 34, 549-551.
- (193). - WALLHÄYBER, K.H. 1975. "Produktions hygiene unter berücksichtigung der grundregeln, GMP". Pharm. 37, 11, 912, 921.
- (194). - WALLHÄUBER, K.H. 1977. "Microbiological aspects on the subject of oral solid dosage farma.". Pharm. Ind. 39, 491-497.
- (195). - WALLHÄUBER, K.H. 1977. "Germ-free-Filtration". J. Pharm. Belg. 32, 5, 463-467.
- (196). - WALLHÄUBER, K.H.1980. "Die mikrobiologische qualität des wassers für pharmazeutische zwecke-auforderungen, aufbereitungsanlagen, prüfmethoden". Pharm. Ind. 42, 1.
- (197). - WESTWOOD, N., BPharm. Ph. D.M.P.S. and PIN-LIM, B., BSc. MSc. 1971. "Microbial contamination of same pharmaceutical raw materials". Pharm.J. july, 31, 99-102.
- (198). - WILL EMSE-COLLINET, M.F., HOSPERG, G.T., TROMP, Tu.F. J. and HVISINGAT. 1978. " Identification of Bacillus species isolated from antacid liquids". J. Appl. Bacteriol. 45, 1-79.

(199). - WOLF, J. and BARKER, A.N. 1968. "The genus Bacillus aids to the identification of its species": Identification methods for microbiol. Ed. Academic Press. New York.

(200). - YLLA-CATALA GENIS, M. 1978: "La formación de aflatoxinas en distintos tipos de féculas de calidad farmacéutica". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Barcelona.

