

EVALUACIÓN DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA EN TAPONES DE GOMA PARA ENVASE DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS DE ACUERDO CON LA NORMA ISO 11737.



TRABAJO DE GRADO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Carrera 7 No. 40-62
Bogotá D.C
NOVIEMBRE 2013**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

*Para ese ANGELITO, que desde el Cielo está conmigo y que siempre recordaré,
amaré y llevaré en mi corazón. Mi amorcito nunca te olvidaré.*

Kelly Johana prieto Vélez.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco ante todo y en primer lugar a Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi madre, Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre, Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha inculcado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanas por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar.

A la universidad javeriana por haberme brindado la oportunidad de estudiar una carrera tan maravillosa, a mis profesores porque me brindaron sus conocimientos, paciencia y dedicación.

Agradezco de manera especial a mi novio Felipe Muñoz, por confiar en mi trabajo, valorarlo y sobre todo por sus ideas, puntos de vista, explicaciones y dedicación siempre incondicional en las dudas que surgieron a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Janeth Arias Bacterióloga y directora de carrera de microbiología de la universidad javeriana por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como profesional. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su

orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntas, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación.

Finalmente quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Carlos Jiménez Poveda por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo que nuestras siempre acaloradas discusiones redundaran benéficamente tanto a nivel científico como personal. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado y, además, ha significado el surgimiento de una sólida amistad. También por sus Orientaciones en los análisis estadísticos, explicaciones metodológicas y por su dedicación y disponibilidad.

I. ÍNDICE

	Pagina
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
4.1. Norma ISO 11737.....	4
4.2. Esterilización.....	5
4.3. Métodos de Esterilización.....	6
4.3.1. Métodos químicos.....	6
4.3.2. Métodos físicos.....	6
4.3.2.1. Calor.....	6
4.3.2.2. Calor húmedo.....	6
4.3.2.3. Calor seco.....	7
4.4. EL GÉNERO <i>Salmonella</i>	7
4.5. MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.....	8
4.5.1. Medios de cultivo selectivos.....	8

4.5.1.2. Agar eosina azul de metileno (EMB).....	8
4.5.1.3. Agar Mac Conkey (MCK).....	9
4.6. DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA PRESENCIA DE <i>Salmonella</i> SP.....	9
4.6.1. Pruebas bioquímicas.....	9
4.6.2. TSI (triple azúcar hierro).....	9
4.6.3. LIA (agar lisina hierro).....	9
4.6.4. Utilización del citrato.....	10
4.6.5. Producción de indol.....	10
4.6.6. Prueba de motilidad.....	11
4.6.7. Hidrólisis de urea.....	11
V. OBJETIVOS.....	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos específicos.....	12
VI. METODOLOGIA.....	12
6.1.1 Obtención de los tapones de goma.....	13

6.2.1. Análisis microbiológico.....	13
6.2.2. Control negativo.....	13
6.2.3. Control positivo.....	13
VII. RESULTADOS.....	14
VIII. DISCUSIONES.....	24
IX. CONCLUSIONES.....	25
X. BIBLIOGRAFIA.....	26
XI. ANEXOS.....	29
11.1. Metodología de análisis de goma.....	29
11.2. Coloración de Gram.....	30
11.3. Siembra de placa.....	31
11.4. Resultados.	32
11.5. Sub-lotes de tapones de goma.	33

I.RESUMEN.

Las normas internacionales de estandarización proporcionan un compendio explicativo acerca de distintos temas; para este trabajo se utilizara como guía la Norma internacional ISO 11737 que indica en su contenido los procesos que se pueden utilizar para validar el procedimiento de esterilización utilizado en una entidad o laboratorio [7].

El proceso de esterilización permite la erradicación de toda forma de vida presente en algún producto, tales como hongos, bacterias y demás microorganismos.

La Norma ISO 11737 además de mostrar el proceso adecuado para esterilizar los tapones de goma muestra cómo se debe realizar la validación de este proceso y la manera de identificar y verificar una posible carga biológica presente en estas materias primas, producto de un incorrecto proceso de esterilización previo [7].

La posible carga biológica encontrada no solo puede ser producto de defectos del proceso de esterilización, también depende de factores tales como la fabricación de componentes de la materia prima, procesos de montaje, entorno de fabricación, gases comprimidos, agua, lubricantes, los procesos de limpieza y de empaque del producto [7].

la metodología que se planteó en este proyecto, fue con base a la instaurada en la norma ISO 11737, donde se indica que por cada 100 productos a evaluar se toma de 3 a 10 por ciento(%) de esta cantidad[6], por lo tanto se evaluó el 30% de los tapones de goma que se tenían como tamaño de muestra (dos sub-lotes de 50 bolsas de 10 unidades cada uno), los cuales fueron introducidos en unos frascos de 100ml que contenían Agar Tioglicolato para el crecimiento de mesofilos y Casoy para hongos y levaduras, después de encontrar algún crecimiento microbiológico se procedió a determinar el tipo de microorganismo contaminante, luego se realizó un conteo de UFC (unidades formadoras de colonia) y por último

se evaluó su carga microbiana. El objetivo de este trabajo es evaluar el método microbiológico para determinar la carga microbiana presente en los tapones de goma para envases de productos farmacéuticos de acuerdo con la norma ISO 11737.

II. INTRODUCCIÓN

El proceso de producción de materias primas para comercialización, requiere de que el producto este certificado con algunas normas que le permitan salir de una mejor manera al comercio; para el laboratorio objeto de este trabajo es necesario estar certificado en la Norma ISO 11737 de esterilización de productos sanitarios [7].

La Norma ISO 11737 ofrece un manual teórico de indicaciones opcionales acerca de la mejor forma de realizar el proceso de esterilización de productos sanitarios y muestra el proceso que se debe aplicar para validar la esterilización realizada [7].

Partiendo de esto, el texto ofrece al lector las mejores prácticas para identificar las posibles cargas microbianas presentes en las materias primas usadas en los laboratorios y el proceso que se debe seguir para tratar esto, ya que puede provenir de la fabricación de las materias primas, los componentes, el entorno de fabricación o los procesos correspondientes a limpieza y empaque del producto [7].

Siguiendo los principios de ISO 11737, AAMI/ISO 11137 y AAMI/ISO 11135, se determinó escogerla norma ISO 11737 ya que Los métodos y procesos expuestos, no tienen que ser seguidos al pie de la letra, ya que son solo indicaciones de las mejores prácticas para hacerlos [7].

La validación de buenos procesos seguidos por el laboratorio tendrá como conclusión la puesta en marcha del proceso de comercialización de los tapones de goma que serán objetivo de estudio en este trabajo

III. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La actual competitividad del mercado farmacéutico a derivado en la necesidad de que los laboratorios estén certificados para distribuir sus propios productos, para lograr esto se debe hacer un riguroso control microbiológico de los recursos desde un inicio, ya que esto permite que todos los procesos siguientes se realicen de una manera correcta, evitando así, perdidas económicas, de tiempo y más importante aún la confianza de las entidades controladoras de la calidad; para este fin se han creado diversas reglamentaciones, como la Norma ISO 11737 para la esterilización de dispositivos médicos, en la cual se va a basar este proyecto [6]. Con el fin de lograr crear, mediante la puesta en práctica, una estandarización del proceso para diagnosticar la presencia o ausencia de microorganismos en los tapones de goma para envases farmacéuticos y definir, de ser necesario, medidas de control para la erradicación de los microorganismos encontrados, todo esto a partir de un certero análisis realizado para definir concretamente que microorganismos son los que hay que eliminar del producto [7].

Para recibir la certificación de la correcta esterilización de los tapones según lo indicado en La Norma ISO 11737 acerca de los métodos microbiológicos para la determinación de la población microbiana en tapones de goma para envase de productos farmacéuticos, se realizará el análisis de una determinada población de estos, para identificar si se encuentran o no organismos microbianos y de esta manera indicar si el proceso de esterilización funciona adecuadamente o deben hacerse correcciones, porque este aspecto, complementario al procedimiento, es esencial para garantizar la calidad del producto sanitario [7].

IV. MARCO TEÓRICO

4.1.1. Norma ISO 11737

Esterilización de productos sanitarios. Métodos microbiológicos. Parte 1: Determinación de la población de microorganismos en los productos (ISO 11737-1:2006/Cor 1:2007) [6].

Esta norma internacional creada en 2006 y corregida en 2007 por el Comité Técnico Europeo ofrece un estándar para el proceso utilizado para determinar la población de microorganismos en los productos y materias primas e indica la manera para realizar la esterilización de estos; este proceso es muy importante para validar que los recursos tienen la suficiente calidad para ir a producción y utilizarlos [6].

Esta norma orienta acerca del proceso para encontrar la cantidad, la cual es menor o igual a uno en un millón, y la calidad de los microorganismos y que con este conocimiento, sean tratados de determinada manera para erradicarlos de los productos [6].

En la norma se aconseja acerca de cómo se deben tomar las muestras de evaluación de la población del producto en estudio, con el fin de tener entidades representativas en el proceso de determinación de una posible carga biológica que se encuentre en ellos [6].

La muestra debe tener las características representativas de toda la población para que el estudio arroje un resultado generalizado y se puedan tomar acciones para todo el objeto en estudio [6].

La carga biológica hace referencia a los posibles microorganismos que se encuentren en el producto evaluado y el conocimiento de esta puede ser utilizado

para validar los métodos de esterilización, hacer seguimiento a los recursos utilizados y comprobar la eficacia de los procedimientos de limpieza a los que es sometida la población evaluada [6].

4.2. ESTERILIZACIÓN

Esterilización es un proceso validado por medio del cual se obtiene un producto libre de microorganismos viables [1]. Esta pretensión de negación absoluta está sujeta a la cinética del proceso, y depende del control estricto del agente esterilizante, del tiempo de acción, de la biocarga presente y de sustancias o eventos que puedan interferir en la acción [2].

El control estricto de estos parámetros, así como las condiciones de envoltura y almacenamiento del material supuestamente estéril, garantizan la eficacia real del proceso [1].

En la esterilización reducimos un mínimo de 6 Log la presencia de microorganismos iniciales. Esta última opción es la más recomendable, cuando el tipo de material lo permite, porque reducimos riesgo de infecciones presentes en superficies, material, sustancia o ambiente [3].

Se considera que un producto crítico es estéril cuando la probabilidad de que un microorganismo esté presente en forma activa o latente es igual o menor de 1 en 1.000.000 esta expresión es lo que internacionalmente se conoce como Nivel SAL (Security Assurance Leve) (coeficiente de seguridad de esterilidad 10^{-6}) [3].

La esterilidad inactiva o destruye a los microorganismos por daños irreversibles causados a nivel celular, este es un proceso validado para obtener un producto libre de todo microorganismo en forma latente o activa, causante de enfermedades o infecciones [2].

4.3. MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN.

Los métodos de esterilización comprenden todos los procedimientos físicos, mecánicos y preferentemente químicos. Estos métodos se emplean para destruir microorganismos patógenos. A través de estos los productos sanitarios alcanzan un estado de desinfección que evita la contaminación.

4.3.1. MÉTODOS QUÍMICOS.

Los métodos químicos generalmente son agentes líquidos que actúan bloqueando una función celular del microorganismo produciéndole la muerte (actúan en la pared celular o membrana, grupos enzimáticos o proteínas) [17].

En el método químico encontramos:

- Ⓢ Óxido de etileno (ETO).
- Ⓢ Peróxido de Hidrogeno.
- Ⓢ Ácido peracético.
- Ⓢ Radiaciones ionizantes..

4.3.2. MÉTODOS FÍSICOS.

4.3.2.1. CALOR: la utilización de este método y su eficacia depende de dos factores: el tiempo de exposición y la temperatura. Todos los microorganismos son susceptibles, en distinto grado, a la acción del calor. El calor provoca desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes irreversibles en los microorganismos [18].

4.3.2.2. CALOR HÚMEDO: este método produce desnaturalización y coagulación de proteínas. Estos efectos se deben principalmente a dos razones:

- El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas son producidas por reacciones que eliminan agua.

- El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire [18].

4.3.2.3. CALOR SECO: el calor seco produce desecación de la célula, es esto tóxico por niveles elevados de electrolitos, fusión de membranas. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con estos [18].

La acción destructiva del calor sobre proteínas y lípidos requiere mayor temperatura cuando el material está seco o la actividad de agua del medio es baja.

4.4. EL GÉNERO *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Estos microorganismos se hallan distribuidos ampliamente en la naturaleza que abarca un amplio rango de huéspedes que van desde animales (reptiles, aves, insectos) hasta humanos, y en los cuales produce un amplio espectro de enfermedades [21].

Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil no formador de esporas y con flagelo peritrico. Los desinfectantes comunes como clorados, iodados y fenoles son eficaces frente a *Salmonella spp* [22]. Al ser un Gram negativo se caracteriza por tener la típica pared celular estratificada rica en lípidos. La capa externa contiene lipopolisacárido (LPS) responsable de la mayoría de las propiedades tóxicas y biológicas de este microorganismo. Unido al lipopolisacárido se encuentran las complejas cadenas de oligosacáridos que determinan especificidad antigénica en las cepas. El peptidoglucano forma una capa definida en la pared celular entre el lipopolisacárido y la membrana citoplasmática. *Salmonella spp* posee además un 10% de lipoproteínas encargadas de la asociación LPS – peptidoglucano [23].

El rango de temperatura para el crecimiento de *Salmonella* esta entre 5.5 y 45 °C y la máxima temperatura en la cual puede desarrollarse, así como empezar a morir, depende de la cepa de *Salmonella* presente y la fase de crecimiento en la que se encuentre, la composición del medio y otros factores como los microorganismos presentes [24].

4.5. MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.

4.5.1. MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS.

Son aquellos que permiten seleccionar ciertos microorganismos deteniendo el desarrollo de otros; esto se logra con el agregado de sustancias inhibitoras como antibióticos, ciertos colorantes, sales biliares, etc. Los medios EMB, MacConkey, permiten detectar con rapidez los microorganismos No fermentadores de 30 lactosa como *Salmonella sp.* y *Shigellasp.* El agente inhibidor en estos medios son sales biliares [25].

4.5.1.2. AGAR EOSINA AZUL DE METILENO (EMB).

Permite demostrar la presencia de *enterobacterias* patógenas y propiciar su aislamiento, sin embargo, no es confirmativo, solo permite una orientación al diagnóstico. El modo de acción del medio se basa en que sus componentes lactosa y sacarosa permiten diferenciar las *enterobacterias* de acuerdo con su capacidad de fermentarlos y por el aspecto y el color de sus colonias. Los colorantes empleados inhiben notablemente el desarrollo de gérmenes Gram Positivos. Las colonias de *Salmonella sp.* Se observan en el medio incoloras o con tonalidad ámbar [26].

4.5.1.3. AGAR Mac CONKEY (MCK).

Las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias Gram Positivas. La lactosa y el indicador rojo neutro permiten

comprobar la degradación de ese disacárido; las colonias lactosa positivas (*Escherichiacoli*) aparecen rojas con halo turbio; las lactosa negativas (*Salmonellaspp.*) son incoloras [25].

4.6. DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA PRESENCIA DE *SALMONELLA SP.*

4.6.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

En la tabla N° 1 es posible observar las reacciones producidas en la batería de bioquímicas utilizada normalmente para la identificación de *enterobacterias* pertenecientes al género *Salmonella* [20], la cual consta de las pruebas descritas a continuación:

4.6.2. TSI (TRIPLE AZÚCAR HIERRO)

Es un agar diferencial basado en la fermentación de azúcares y la producción de H_2S y gas. Contiene glucosa, sacarosa y lactosa; estas últimas en una concentración 10 veces mayor a la glucosa. El indicador de pH es el rojo de fenol, el cual vira a amarillo por formación de ácido a partir del carbohidrato, el sulfato ferroso es un detector de la producción de ácido sulfhídrico. Por lo general *Salmonella sp.* Da como resultado de esta prueba una reacción alcalina/ácido con producción de H_2S que se evidencia por el fondo negro del tubo (K/A H_2S ++); en ocasiones, como resultado de la fermentación de glucosa también hay producción de gas [20] [26].

4.6.3. LIA (AGAR LISINA HIERRO).

El fundamento de esta prueba es que los procesos de descarboxilación y diseminación en el medio de cultivo tienen lugar con la previa fermentación del carbohidrato que contiene el medio (glucosa) y la acidez producida por esta reacción, si el microorganismo posee las descarboxilasas necesarias, se produce la descarboxilación liberándose como producto final las aminas que alcalinizan el

medio de cultivo, por otro lado si el microorganismo posee las deaminasas se efectúa la deaminación y el producto final son ácidos orgánicos que acidifican el medio de cultivo. *Salmonella sp.* Por lo general da como resultado tendido púrpura y fondo púrpura, (K/K), con producción de H₂S y gas, es decir, posee la enzima lisina-decarboxilasa [26].

4.6.4. UTILIZACIÓN DEL CITRATO.

El principio de esta prueba es determinar la capacidad de los organismos para usar el citrato de sodio como fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento. El medio contiene fosfato sódico de amonio, fosfato de monopotasio, sulfato de magnesio, citrato de sodio y azul de bromotimol como indicador de pH. Si el carbono del citrato de sodio es utilizado, el nitrógeno también es extraído del fosfato de amonio contenido en el medio, liberando amonio, lo cual alcaliniza el medio que vira de verde a azul. *Salmonella sp.* por lo general utiliza el citrato como fuente de carbono, por lo cual se produce una variación en el color del medio [20] [26].

4.6.5. PRODUCCIÓN DE INDOL.

Esta prueba se desarrolla para determinar si la bacteria en estudio está en capacidad de desdoblar el indol de la molécula de triptófano; el indol es uno de los componentes de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La prueba se basa en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p- dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovacs y Ehrlich, utilizados para la identificación de producción de indol por parte de los microorganismos. *Salmonella sp.* no tiene la capacidad de generar el indol por lo cual no se presenta ninguna reacción en el medio [20] .

4.6.6. PRUEBA DE MOTILIDAD.

Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. La movilidad de las bacterias es consecuencia de la presencia de flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos, aunque algunas formas de cocos son móviles. Esta prueba es llevada a cabo en un medio de cultivo semisólido (SIM), donde a su vez es evaluada la producción de indol y de ácido sulfhídrico por los microorganismos. Las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos [26].

4.6.7 HIDRÓLISIS DE UREA.

La urea es un compuesto orgánico nitrogenado que es transformado por algunos microorganismos, los cuales producen la enzima ureasa. Como resultado de esta actividad microbiana, el nitrógeno es liberado en forma inorgánica como moléculas de amoníaco. Cuando esta reacción ocurre, el medio de cultivo se alcaliniza y el indicador de pH permite percibir visualmente el cambio de coloración en el medio debido a la acidificación producida en el mismo. *Salmonella sp.* no tiene la capacidad de hidrolizar la urea, por lo tanto la prueba es negativa. Esta prueba se considera vital en la diferenciación bioquímica entre *Salmonella sp.* y *Proteus sp.* [20].

Tabla N°1 Resultados de las pruebas bioquímicas clave para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Salmonella sp.* Fuente: manual de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (MacFaddin 2000)

PRUEBAS BIQUIMICAS	RESULTADOS PARA <i>Salmonella SP.</i>
TSI.	K/A H ₂ S++
LIA.	K/K H ₂ S++
MOTILIDAD.	+
UREA.	-
INDOL.	-
CITRATO.	+

V .OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

5.1.1 Evaluar el método microbiológico para determinar la población microbiana presente en tapones de goma para envases de productos farmacéuticos de acuerdo con la norma ISO 11737

5.2 Objetivos específicos.

5.2.1. Determinar la presencia o ausencia de microorganismos en tapones de goma.

5.2.2. Realizar un conteo de Unidades Formadoras de Colonias.

5.2.3. Medir la carga microbiana presente en Iso tapones de goma.

5.2.4. Identificar el tipo de microorganismo presente en los tapones de goma por medio de una batería bioquímica.

VI. METODOLOGIA

- **tamaño de la población (lote total):** **XXMK357JK**1.000 unidades de tapones de goma de la empresa **CAFARCOL** Caucho butílico sintético Farmacéuticos Col.
- **Referencia:** 12x8 diámetro.
- **Sub-lote:** 2 sub-lotes de 500 unidades
- **Bolsa:** 50 bolsas de 10 unidades.

6.1.1 OBTENCIÓN DE LOS TAPONES DE GOMA

- **Tamaño de muestra:** evaluaremos 60 bolsas tomando 5 unidades de tapones de cada una, dándonos un total de 300 muestras.

- **Porcentaje evaluado:** según la literatura, por cada 100 productos a evaluar se tomara del 3 al 10% del producto total [6], en este caso como el lote a evaluar es de 1000 tapones de goma, utilizaremos el 30% de la población total. Los tapones de goma fueron entregados por la empresa **CAFARCOL**.

6.2.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

6.2.2. CONTROL NEGATIVO.

Se introdujo 10 tapones de goma en cada frasco de 100 ml de medios de cultivo líquido como fue el Tioglicolato para rescatar mesofilos y el caldo Casoy para hongos y levaduras (**Imagen N°1A, B, C Y D.**), e incubamos de 28-48Horas X30°C a35°Cy 7Días X20°C a 25°C [6].Posteriormente se leyeron por turbidez, observando así ningún crecimiento microbiológico (**tabla N°.2**).

6.2.3. CONTROL POSITIVO.

Para el control positivo se utilizaron 20 tapones de goma, de los cuales se contaminaron10 tapones con *Salmonella sp.*, al azar.

Los tapones de goma contaminados se introdujeron en un frasco grande de medio de cultivo líquido como fue el Tioglicolato y se incubo, Posteriormente se leyó por turbidez, observando así una leve turbidez, dando como resultado un crecimiento microbiológico de **BGN** (Bacilos Gram Negativos), (**Imagen N°2.**)a partir de este crecimiento se realizó la identificación fenotípica por medio de coloración de Gram (**Imagen N°3.**).

Posteriormente se realizó un repique en Agar EMB y en Agar Mc Conkey, con el fin de obtener un crecimiento colonial microbiológico (**imagen N°4 A, B y C**),después se realizó una coloración de Gram (**imagen N°5A Y B**) y se determinó

el tipo de microorganismo contaminante en los tapones de goma (**tabla N°. 3**) (**imagen N° 6.**).

A su vez, a partir del cultivo puro del Agar Mc Conkey se procedió a realizar una suspensión de 0.5 de Mc Farland, después de la suspensión marcamos 6 tubos de solución salina de 4.5ml con las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (**imagen N°A7**), para transferir 0.5ml de la suspensión de la escala de Mc Farland en cada tubo previa marcación. Mezclamos la suspensión con vórtex durante unos segundos y transferimos 0.5ml de la dilución 10^{-1} al siguiente tubo, repetimos este paso hasta llegar a la dilución 10^{-6} .

Para la siembra en la caja de Petri (Agar Nutritivo) se marcó una caja con la dilución 10^{-6} (**Imagen N°8 A**), después de marcar la caja se procedió a sembrar 0.1ml de la última dilución sobre la superficie de la caja rotando y esparciendo la muestra en todas las direcciones e incubar.

Tras la incubación se observaron las colonias sobre la superficie del agar y procedimos hacer el recuento de UFC (**Imagen N°8B**).

Si el producto es mayor o igual a 10 UFC. Utilizar la siguiente fórmula para determinar la carga biológica [7] (**Grafico N°1 y 2**).

$$Y = \log_{10}(x + 0,1)$$

Formula tomada de la norma ISO 11737.

Y= recuento transformado [7].

X= recuento original[7].

VII. RESULTADOS.

Se analizó un total de 300 tapones de goma del laboratorio **CAFARCOL** que correspondieron al lote con referencia **XXMK357JK**, el cual se dividió en 2 sub-lotes de 50 unidades el cual se encuentra en 10 bolsas de 50 unidades cada una.

$$\begin{array}{l}
 1000U \rightarrow 100\% \\
 X \rightarrow 30\% \\
 \\
 X = \frac{1000 U \times 30\%}{100\%} \quad \boxed{X = 300 U}
 \end{array}$$

Los aislamientos obtenidos por cada 5 tapones de goma utilizados por cada sub-lote, arroja como resultado un aislamiento negativo (NG). **Tabla N°2.**

Tabla N° 2. Aislamientos negativos obtenidos de los tapones de goma.

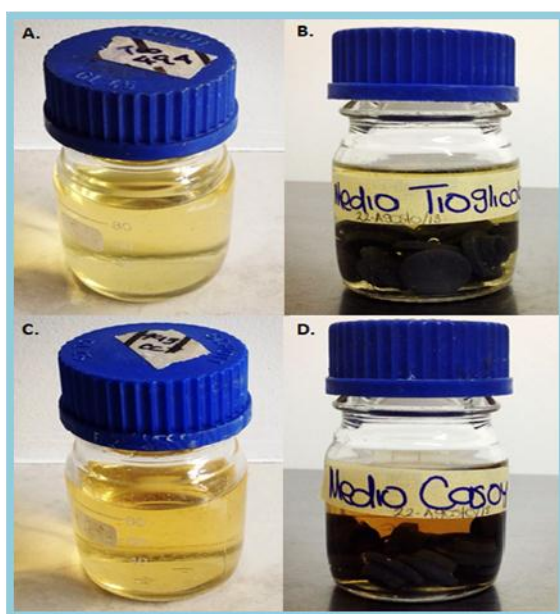
AISLAMIENTOS OBTENIDOS.							
N°.	Lote.	CTD.	Resultados	N°.	Lote.	CTD.	Resultados.
1	YXQ3050M	5	NG.	2	OCT1176O	5	NG.
3	KJP4258L	5	NG.	4	JKL0978P	5	NG.
5	DSI1100R	5	NG.	6	QSR7534Y	5	NG.
7	PJP8045L	5	NG.	8	GHU2543T	5	NG.
9	PSC5563Z	5	NG.	10	WXZ8654K	5	NG.
11	CPT1111Q	5	NG.	12	ÑKY5924H	5	NG.
13	MPV8430D	5	NG.	14	HBG6431G	5	NG.
15	PVG9760S	5	NG.	16	PUL4769J	5	NG.
17	FAM0728C	5	NG.	18	BVZ0012R	5	NG.
19	BCM3031D	5	NG.	20	HYT8754L	5	NG.
21	LLD0001E	5	NG.	22	YTG8900M	5	NG.
23	ANT2200M	5	NG.	24	ÑLK0809U	5	NG.
25	LAD0181L	5	NG.	26	TRR6700X	5	NG.
27	DCN1914R	5	NG.	28	VIE8521Y	5	NG.
29	RTC4532Ñ	5	NG.	30	PLZ6700J	5	NG.
31	QWE5986P	5	NG.	32	YGT653P	5	NG.
33	LMJ9616L	5	NG.	34	LPP479O	5	NG.
35	FÑC3257O	5	NG.	36	MJU587M	5	NG.

37	LJM8203Q	5	NG.	38	ÑKI641H	5	NG.
39	JSM5874P	5	NG.	40	EUV238G	5	NG.
41	LKI3259L	5	NG.	42	RSM098Y	5	NG.
43	MNB7461H	5	NG.	44	AVP627V	5	NG.
45	OUH4500K	5	NG.	46	KJP280V	5	NG.
47	WSD4853P	5	NG.	48	DVM098G	5	NG.
49	MJT0269B	5	NG.	50	GFT538H	5	NG.
51	BVF0457Z	5	NG.	52	KWY635H	5	NG.
53	ZXY8562Y	5	NG.	54	WXX410B	5	NG.
55	TYH3090F	5	NG.	56	JFM085V	5	NG.

NG: negativo.

En la **imagen N°1 A**. Se observa el medio Tioglicolato sin ningún tapón de goma, posteriormente se introducen en él 10 tapones de goma después de la incubación, **imagen N°1 B**. En la **imagen N°1 C**. Se puede observar el medio Casoy sin ningún tapón de goma donde posteriormente se introducirían 10 tapones de goma después de la incubación, **imagen N°1 D**.

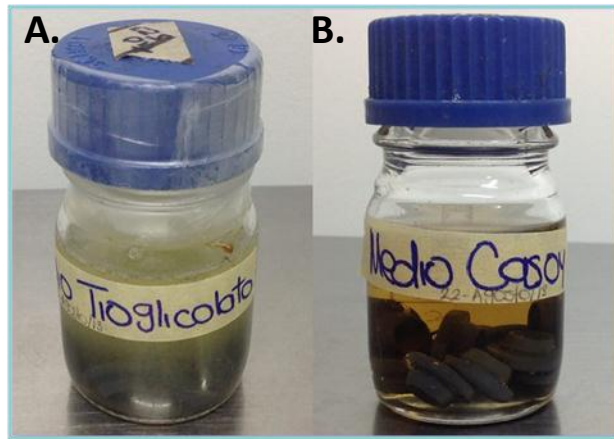
Imagen N°1. Medios.



A y B. Medio Tioglicolato C y D. Medio Casoy

En la **imagen N°2 A** se observa un crecimiento microbiológico en el medio tioglicolato. Mientras que en la **imagen N°2 B** se observa el medio casoy sin crecimiento microbiológico.

Imagen N°2.



A. Medio Tioglicolato con crecimiento microbiológico. **B.** Medio Casoy sin contaminación.

Posteriormente en la **imagen N°3** se observa una coloración de Gram realizada a partir del medio tioglicolato, donde se visualiza un crecimiento de bacilos Gram negativos.

Imagen N°3. Coloración Gram.

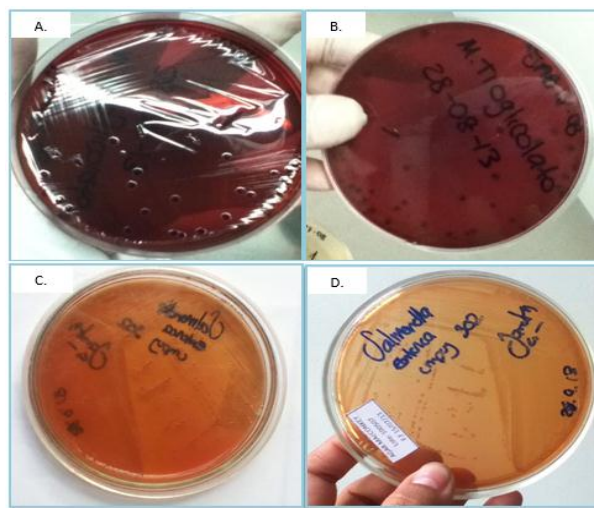


Se observan 100X, crecimiento de Bacilos Gram Negativos.

En la **imagen N°4** se observa el anverso y el reverso del Agar EMB; en el anverso **(A)** de este se observa un leve crecimiento de colonias redondas, pequeñas

incoloras y en el reverso (**B**) se observa un leve crecimiento microbiológico. En el Agar Mc Conkey (**C y D**), se observa un crecimiento de colonias incoloras, con bordes definidos y tamaño regular. *Salmonellasp.* No tiene la capacidad de degradar la lactosa presente en el medio, por lo cual las colonias se consideraban sospechosas cuando no presentaban ninguna coloración y se identifican como colonias lactosa negativa

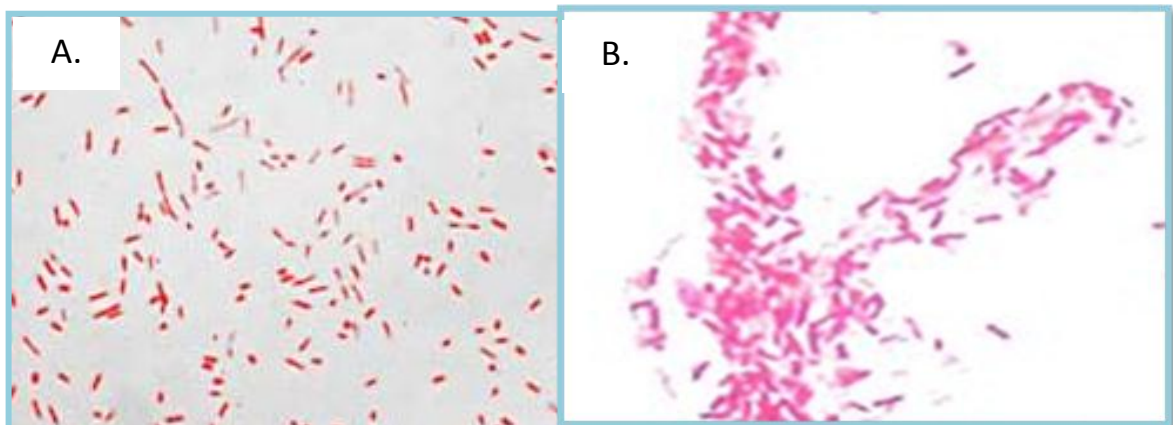
Imagen N°4. Agar EMB y Agar Mc Conkey.



A. Anverso del medio EMB con un leve crecimiento de colonias redondas y pequeñas de incoloras. **B.** Reverso del medio EMB, se observa leve crecimiento microbiológico. **C y D.** Anverso Y Reverso del medio Mc Conkey con un leve crecimiento microbiológico con presencia de colonias incoloras.

Se pueden observar bacilos Gram negativos en la **Imagen N° 5 A y B** de los medios anteriormente mencionados.

Imagen N°5. Coloración Gram del cultivo.



A. Coloración de Gram a partir del cultivo EMB. Se observan Bacilos Gram Negativos.

B. Coloración de Gram a partir del cultivo Mc Conkey. Se observan Bacilos Gram Negativos.

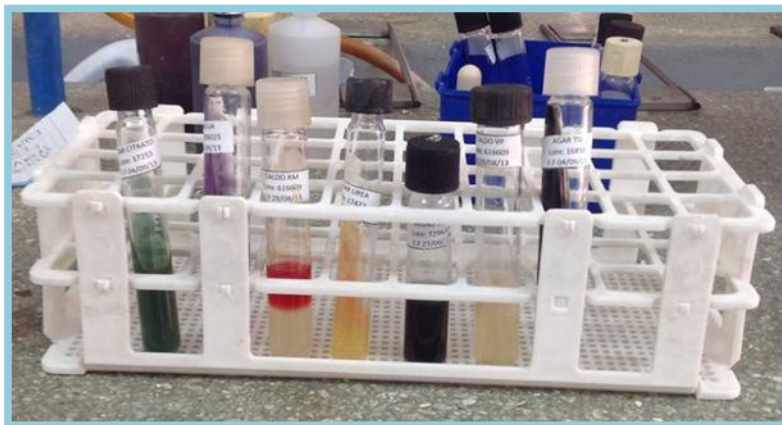
Para las pruebas bioquímicas se realizó el reconocimiento de acuerdo con el metabolismo de los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* sp. Se llevó a cabo mediante una batería bioquímica para bacterias no fermentadoras, dándonos como resultado CITRATO positivo, LIA K/A H₂S+, CALDO RM positivo, UREA negativa, TSI K/A H₂S+, CALDO VP negativo, MOTILIDAD. Positiva, SIM H₂S+ INDOL negativo. **Imagen N°6 y Tabla N° 3.**

Tabla N°3. Pruebas bioquímicas

PRUEBAS BIQUIMICAS.	RESULTADOS.
CITRATO	+
LIA	K/A H ₂ S+
CALDO RM	+
UREA	-
TSI	K/A H ₂ S+
CALDO VP	-
MOTILIDAD.	+
SIM	H ₂ S+ INDOL-

Pruebas bioquímicas con sus respectivos resultados.

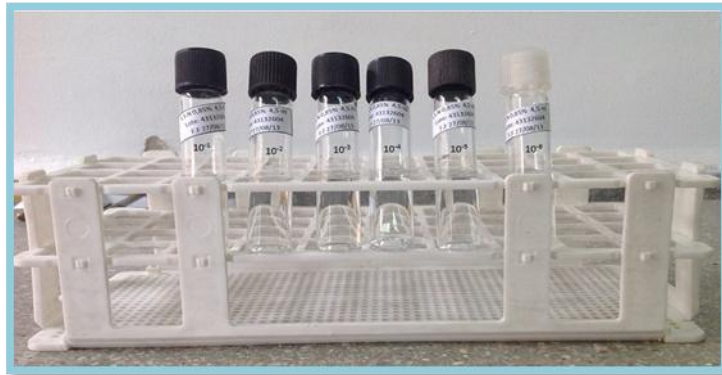
Imagen N°6. Batería Bioquímica.



Pruebas bioquímicas evaluadas para la caracterización de Salmonella aislada de los 10 tapones de goma evaluados.

En la **imagen N°A7** se observan diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , con el fin de transferir 0.1ml de la última dilución sobre la superficie de toda la caja.

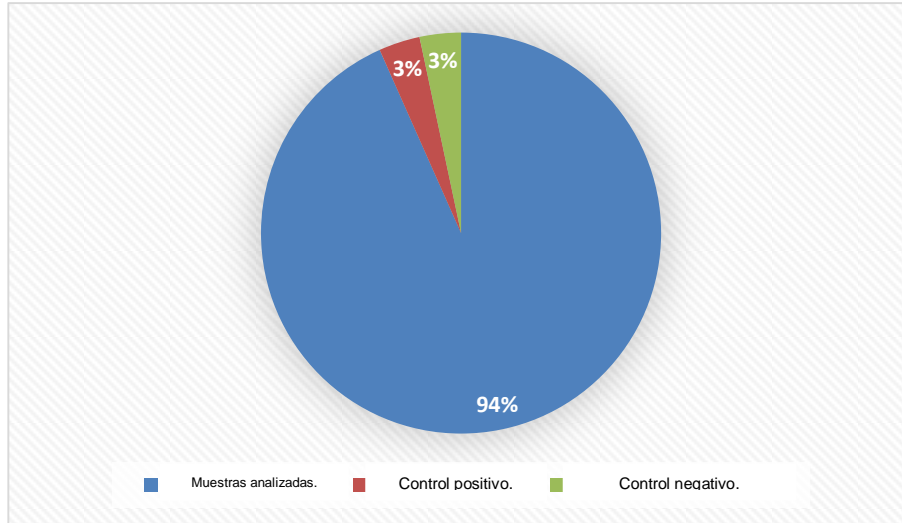
Imagen N°7 diluciones.



Diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en solución salina.

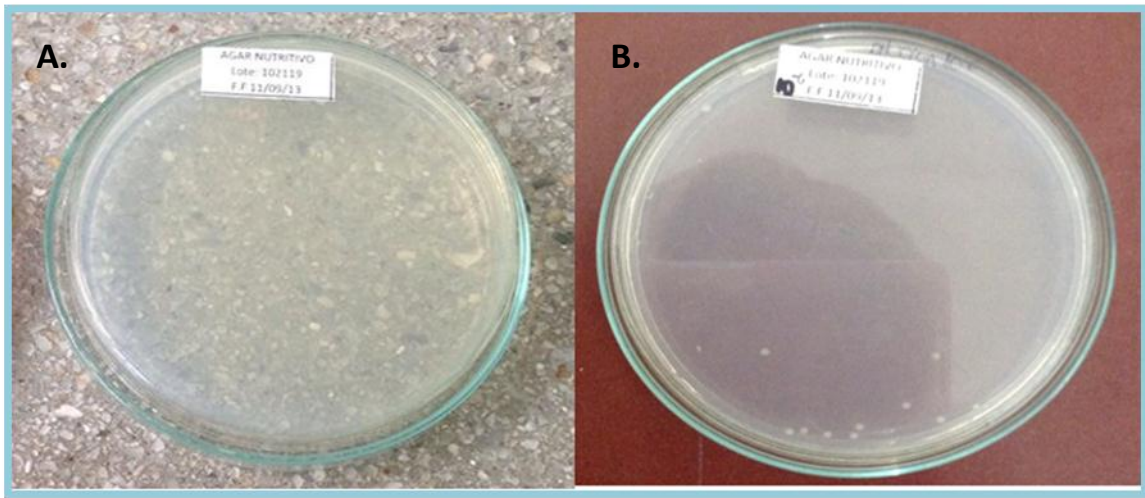
En la **imagen N° 8A** podemos observar el agar nutritivo antes de transferirle 0.1ml de la dilución 10^{-6} como control negativo, y en la **imagen N° 8B** se puede observar el Agar nutritivo después de su incubación con un leve crecimiento de UFC (**12 UFC**) (**Grafica N°2**)

Grafica N° 1 Carga microbiana.



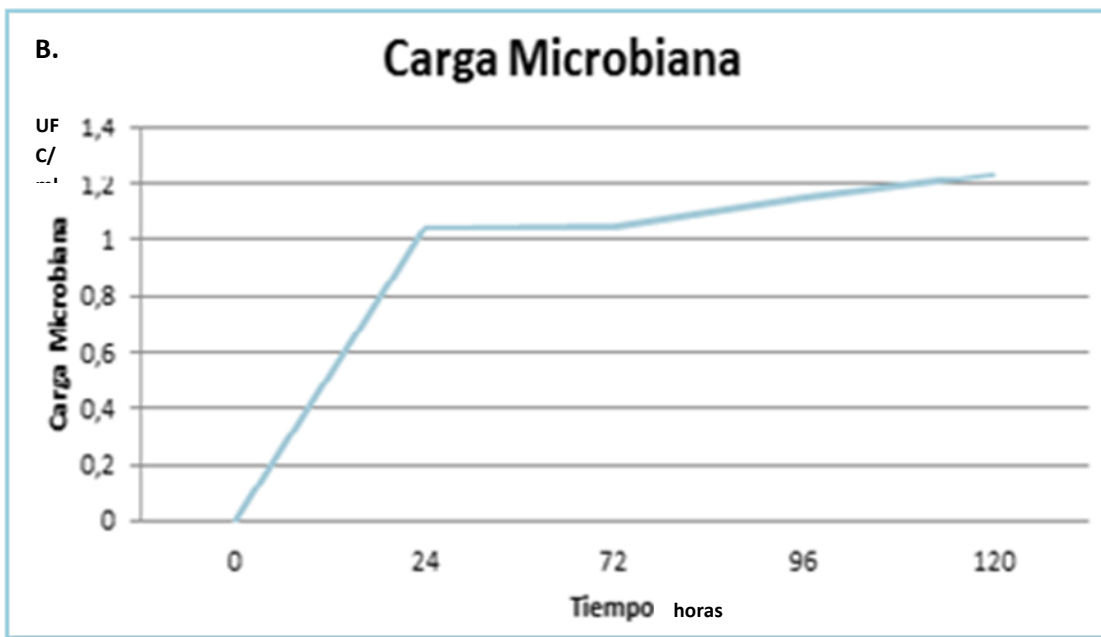
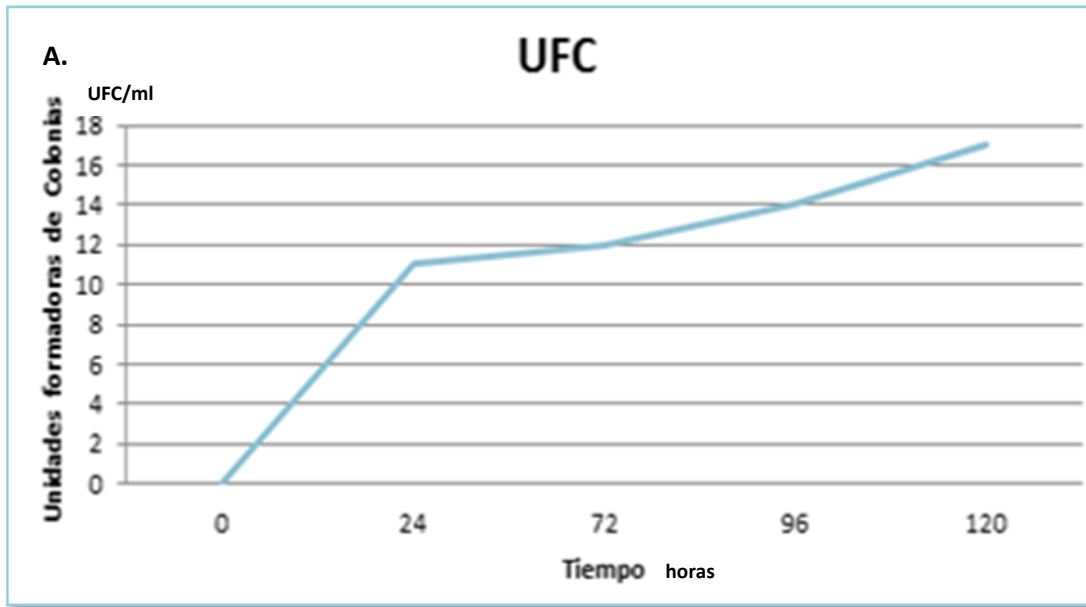
Porcentaje de los tapones de goma utilizados como control positivo, control negativo y muestras analizadas. (Aislamientos negativos obtenidos de los tapones de goma).

Imagen N8. Agar nutritivo.



A. Agar nutritivo antes de la siembra. **B.** Agar nutritivo después de la siembra, con 12 UFC.

Grafica N°2



A. Grafica de un sistema de coordenadas el tiempo en horas (eje X) y el número de unidades formadoras de colonias UFC/ml (eje Y). **B.** Grafica de un sistema de coordenadas tiempo (eje X) y la cantidad de carga microbiana presente en el cultivo.

Tiempo (h)	0	24	72	96	120
UFC	0	11	12	14	17
Carga Microbiana	0	1,041	1,049	1,146	1,23

VIII. DISCUSION.

Algunos estudios citados en la literatura, reportan, que los rangos de incubación para bacterias aerobias son de 2 a 5 días, para hongos de 5 a 7 días y de 3 a 5 días para las bacterias anaerobias, esto implica un aumento de la masa celular que eventualmente conduce a la multiplicación celular. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial, este crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos (2) células hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica. Basándonos en los resultados, se determinó que con el fin de enumerar con precisión la carga biológica, los periodos de incubación será hasta los 5 días para bacterias anaerobias (*Salmonella*) [14]. Los resultados del presente trabajo demuestran que durante el estudio de análisis de la ausencia de carga microbiana en los tapones de goma fue de 280 (94%) tapones por cada 1000 tapones del lote total. Con base a estos resultados se interpreta que los tapones de goma del lote **XXMK357JK** del laboratorio **Cafacol** se encuentran libres de presentar alguna carga microbiana. Para la identificación de la presencia de carga microbiana en los tapones de goma se contaminaron, mediante inoculación (contaminación artificial) con *una* bacteria anaerobia, 10 tapones (3%) de la población total del lote **XXMK357JK**, presentando durante un periodo de incubación de uno a cinco días, teniendo como resultado un incremento en la carga microbiana de 1.041 al primer día hasta 1.23 al quinto día. Con base a este resultado se puede interpretar que los tapones de goma presentan un leve incremento en la carga microbiana de acuerdo al periodo de incubación de la bacteria. Los 10 tapones de goma fueron contaminados para realizar la identificación del microorganismo contaminante. Para determinar dicho microorganismo primero se realizó un Gram observando así BGN (Bacilos Gram Negativos), como la prueba Gram es para identificar su morfología mas no el tipo

de microorganismo, se inoculo en una batería bioquímica que estaba conformada por CITRATO, LIA CALDO RM, UREA, TSI, CALDO VP, SIM, identificando como microorganismo contaminante *Salmonella*, como sabemos salmonella es más frecuente encontrarla en alimentos, pero para este estudio se escogió ya que es un patógeno que afecta a los seres vivos.No se observó otro microorganismo presente en dichos tapones. Por otro lado los otros 10 (3%) tapones de goma del tamaño de la muestra no fueron contaminados pero se introdujeron en el medio líquido Casoy, observando así ningún crecimiento microbiológico.

Este estudio podría demostrar que los tapones de goma del laboratorio **CAFACOL** se encuentran libres de contaminación microbiana.

IX. CONCLUSIONES.

- Se logró evaluar un método microbiológico para determinar la carga microbiana presente en tapones de goma analizados del laboratorio **CAFARCOL**.
- Al contaminar artificialmente los tapones de goma, se encontró al término de 120 horas una carga microbiana de 1.23, lo que indica la eficacia del método utilizado.
- Al realizar el procedimiento de identificación del microorganismo contaminante, mediante una batería bioquímica, se encontró que era *Salmonella sp*; causando que el producto analizado no salga a su venta.

X. BIBLIOGRAFIA.

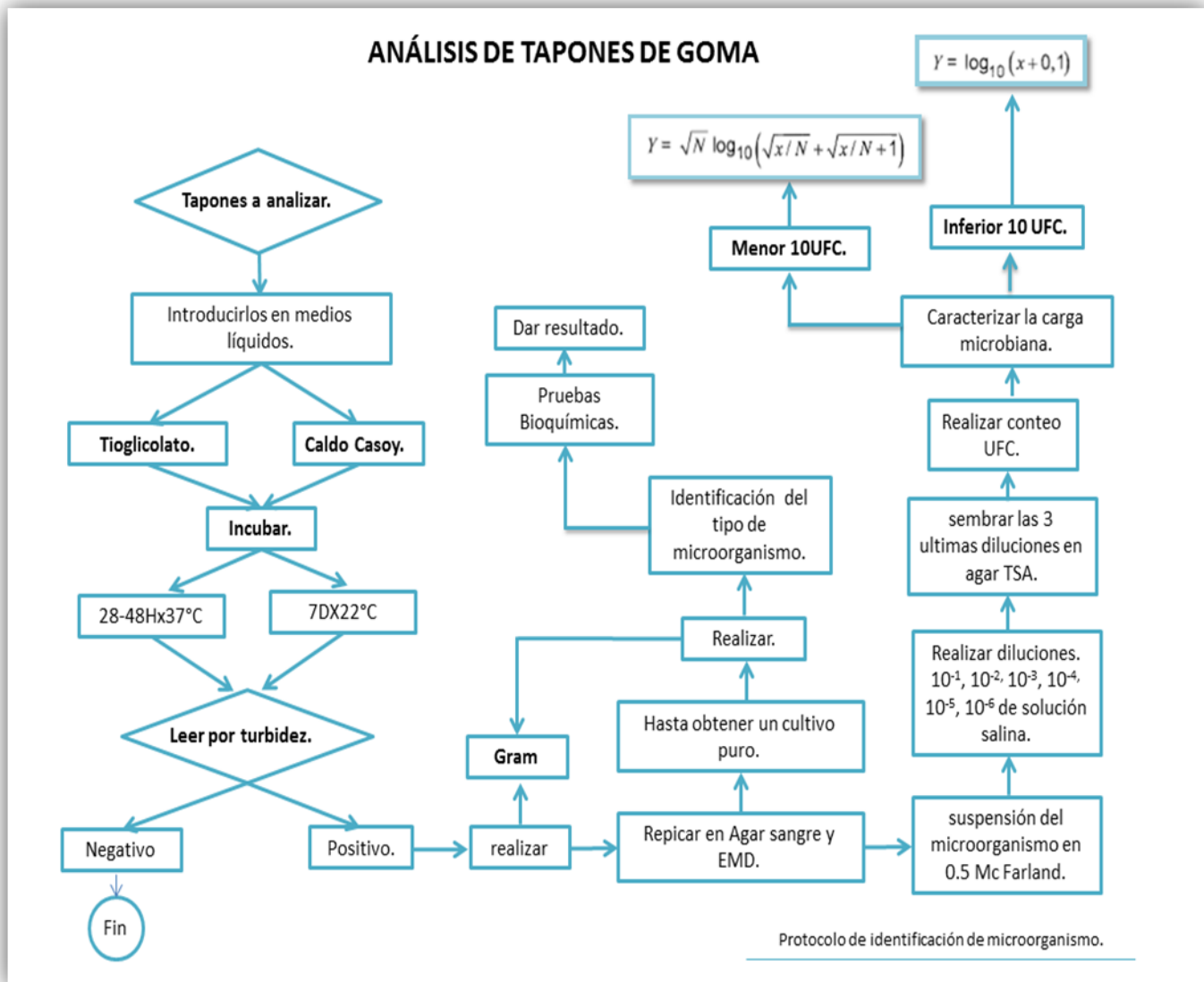
1. Rodríguez AU. Técnicas de vigilancia de infecciones hospitalarias. En: Rodríguez C, ed. Procedimientos técnicos en microbiología clínica. La Habana: Editorial Ciencia y Técnica; 2003.
2. Rutala WA. Disinfection, sterilization and waste disposal. In: Wenzel RP, ed. prevention and control of nosocomial infection. Baltimore: William and Wilkins. 2nd. Edition; 1999.
3. Rodríguez AU, LLamos RA. Vigilancia microbiológica en la atención primaria de salud. MG RevMex Patol Clin. 2004;51(3):178-81.
4. MINSAP. Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones Hospitalarias. La Habana; 2001.
5. Rodríguez AU. Infección hospitalaria. Resistencia bacteriana “in vitro” a los antimicrobianos en uso de instituciones de salud de Ciudad de La Habana. Año 2003. Rev Panam Infect. 2004;6(3).
6. ANSI/AAMI/ISO 11737-1, Sterilization of Health Care Products-Microbiological Methods—Part 1: Determination of the Population of Microorganisms on Product, 2006.
7. Confederación Latinoamericana de bioquímica clínica. Gestión de la calidad en el Laboratorio Clínico. Editorial médica Panamericana. PP 1-47.
8. ISO 7870: Control charts -General guide and introduction.
9. ISO 7873: Control charts for arithmetic average with warning limits
10. ISO 7966: Acceptance control charts.
11. SHEWHART, W.A., Economic Control of Quality of Manufactured Product. D. Van Nostrand, Co., New York, 1931, 501 pp.
12. NELSON, L.S., The Shewhart Control Chart -Test for Special Causes. Journal of Quality Technology. 16. No.4 October 1984, pp.237-239
13. NELSON, L.S. Interpreting Shewhart X Control Charts, Journal of Quality Technology, 17 No. 2 April 1985, p.p. 114-116.
14. ANSI/AAMI/ISO 11137-2, Sterilization of Health Care Products—Part 2: Establishing the Sterilization Dose, 2006.

15. ASTM E178-08, Standard Practice for Dealing with Outlying Observations.
16. Bryans, T., 1996. Using Bioburden Spikes in Radiation Dose Setting, vol. 3 (1). The Validation Consultant
17. http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/patolqui/patolqui_004.htm].
18. www.alfinal.com/Salud/esterilizacionmetodos.php].
19. Cunha, BA. Antibiotic resistance. Med Clin North. 84, 2000. p 1407 – 1421.
20. MacFADDIN J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
21. PARRA, M.; DURANGO, J. y MATTAR, S. 2002. Microbiología, Patogénesis, Epidemiología, Clínica y Diagnóstico de las Enfermedades Producidas por Salmonella . Revisión de Tema. Mvz-Córdoba 7(2): 187 – 200.
22. MEJIA, W. 2003. Epidemiología de la Salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis Doctoral . Universidad Autónoma. Barcelona, España.
23. HIRSH, D. 1999. Veterinary Microbiology. Blackwell Science . Malden, Massachusetts. Pp 54 – 61.
24. DOYLE, M.E. y MAZZOTTA, A.S. 2000. Review of studies on the thermal resistance of Salmonellae . Journal of Food Protection 63: 779-795
25. NÉSTOR OSCAR STANCHI. 2010. Microbiología Veterinaria Médica S.A.I.C.I . Médica S.A.I.C.I .
26. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2013. <http://www.ins.gov.co/Paginas/inicio.aspx>

ANEXOS.

ANEXO1.

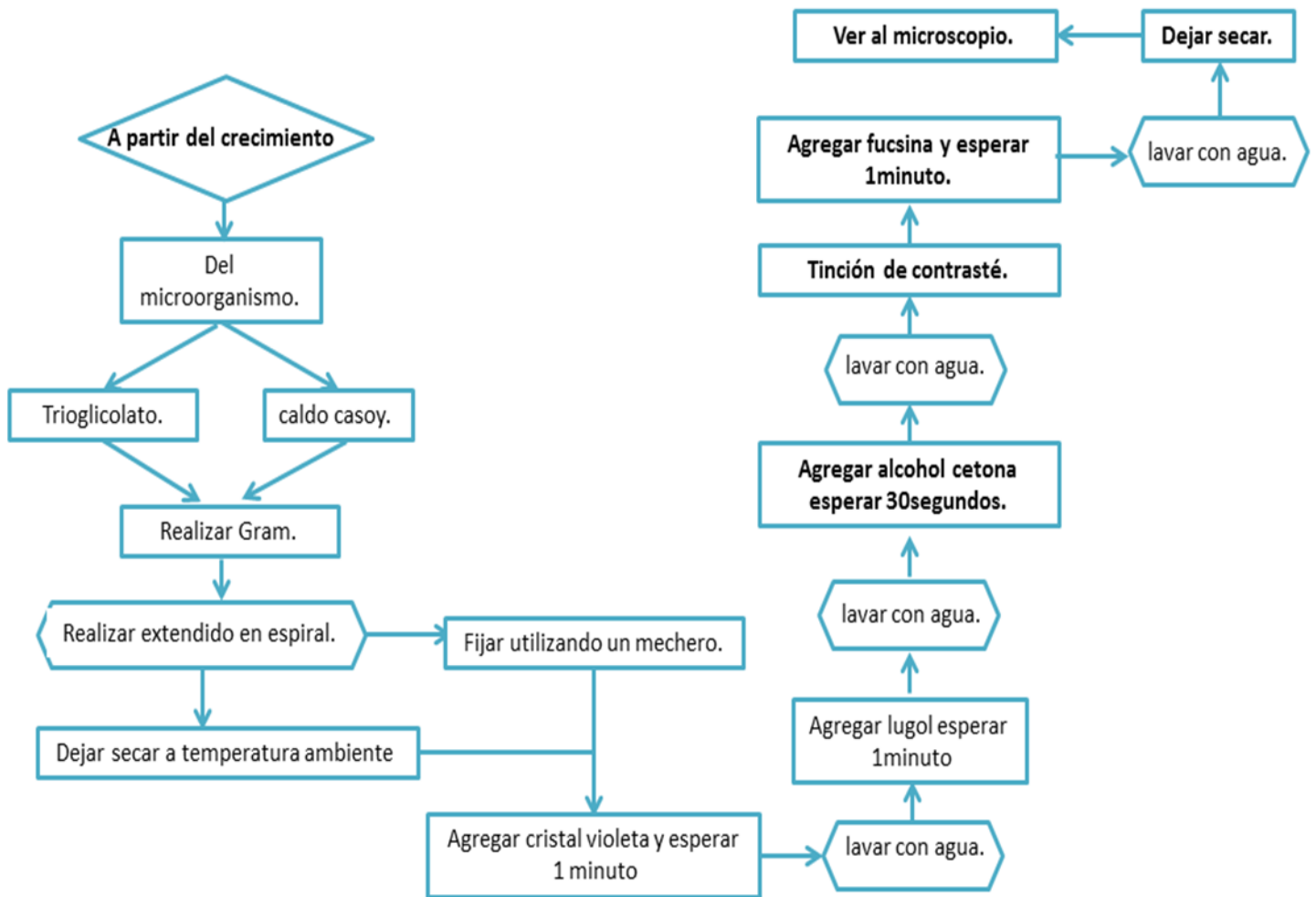
METODOLOGA DE ANALISIS DE GOMA.



ANEXO 2.

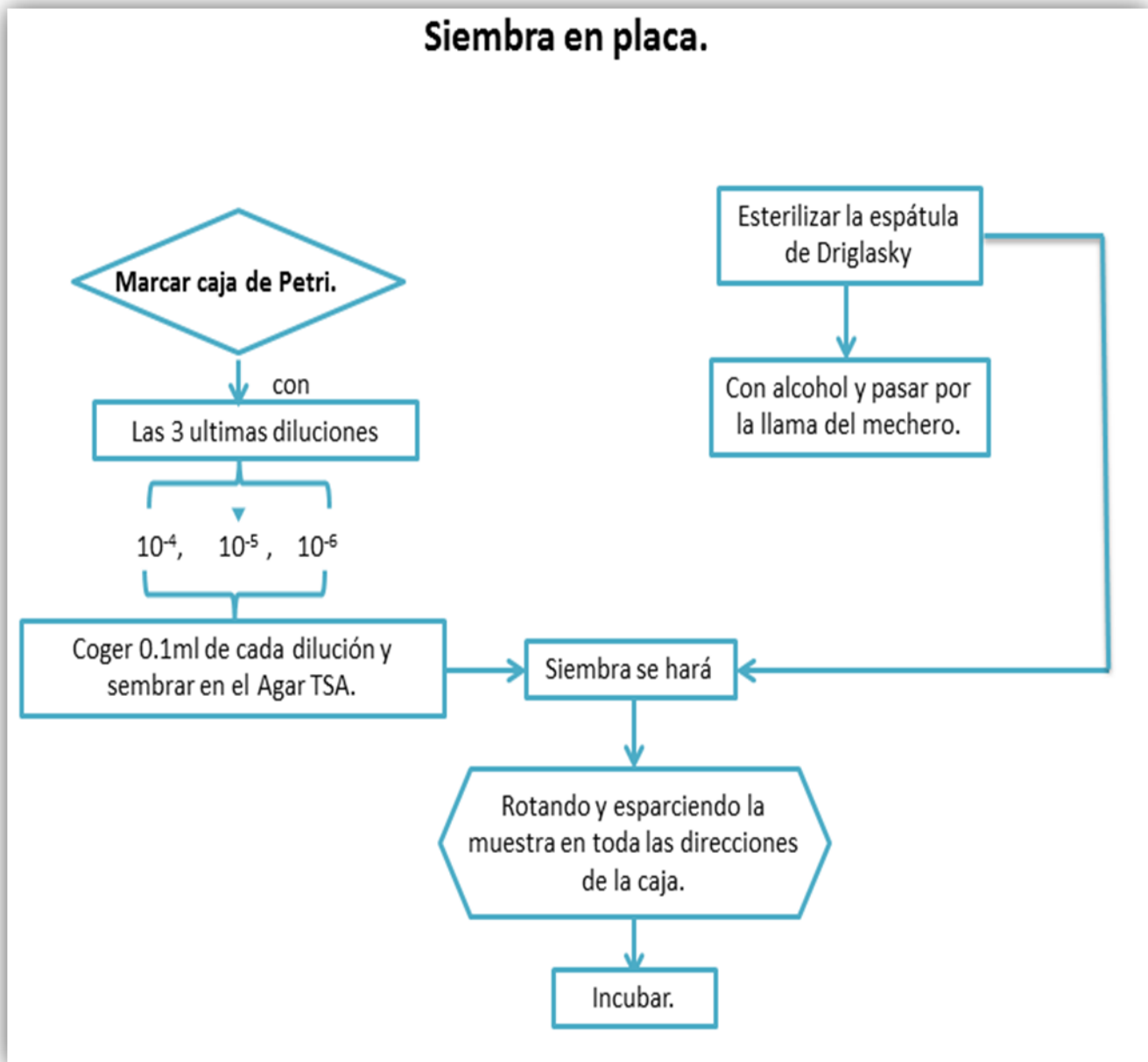
COLORACION DE GRAM.

COLORACIÓN GRAM.



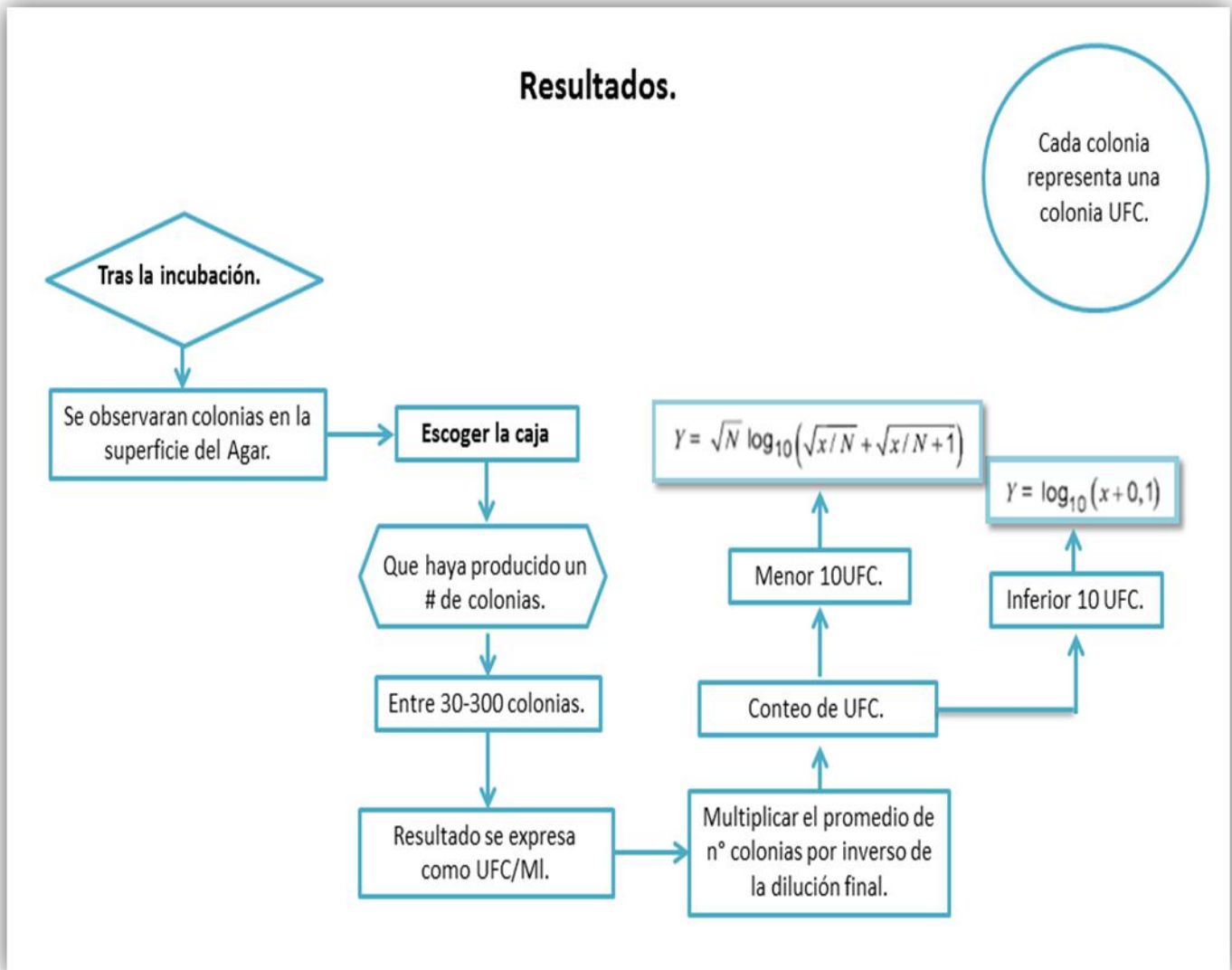
ANEXO 3.

SIEMBRA DE PLACA.



ANEXO 4.

RESULTADOS.



ANEXO N°5.

SUB-LOTES DE TAPONES DE GOMA.



ANEXO 3
BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO
FORMULARIO

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO			
EVALUACIÓN DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA EN TAPONES DE GOMA PARA ENVASE DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS DE ACUERDO CON LA NORMA ISO 11737.			
SUBTÍTULO, SI LO TIENE			
AUTOR O AUTORES			
Apellidos Completos		Nombres Completos	
Prieto Vélez		Kelly Johana	
DIRECTOR (ES) TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			
Apellidos Completos		Nombres Completos	
Arias Palacios.		Janeth Del Carmen.	
Jiménez Poveda.		Juan Carlos.	
FACULTAD			
Ciencias			
PROGRAMA ACADÉMICO			
Tipo de programa (seleccione con "x")			
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado
x			
Nombre del programa académico			
Bacteriología.			
Nombres y apellidos del director del programa académico			
Diana Patiño.			
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:			
Bacterióloga.			
PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):			

CIUDAD	AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO		NÚMERO DE PÁGINAS
Bogotá DC	2013		41
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")			

Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		X			X	
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.						
MATERIAL ACOMPAÑANTE						
TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO			
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?	
Vídeo						
Audio						
Multimedia						
Producción electrónica						
Otro Cuál?						
DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. <i>(En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co, donde se les orientará).</i>						
ESPAÑOL			INGLÉS			
Norma ISO 11737.			ISO 11737.			
Esterilización.			Sterilization.			
Agar Tioglicolato.			Thioglycollate Agar.			
Agar Casoy.			Casoy Agar.			
RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS (Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)						
RESUMEN: Las normas internacionales de estandarización proporcionan un compendio explicativo acerca de distintos temas; para este trabajo se utilizara como guía la Norma internacional ISO 11737 que indica en su contenido los procesos que se pueden utilizar para validar el procedimiento de esterilización utilizado en una entidad o laboratorio [7]. La carga biológica encontrada no solo puede ser producto de defectos del proceso de esterilización, también depende de factores tales como la fabricación de componentes de la materia prima, procesos de montaje, entorno de fabricación, gases comprimidos, agua, lubricantes, los procesos de limpieza y de empaque del producto [7].						

La metodología que se planteó en este proyecto fue evaluar el 1% de los tapones de goma que teníamos como tamaño de muestra (10 bolsas de 500 unidades), los cuales serán introducidos en unos frascos que contienen Tioglicolato para el crecimiento de mesofilos y Casoy para hongos y levaduras. El objetivo de este trabajo es estandarizar el método microbiológico para determinar la carga microbiana presente en los tapones de goma para envases de productos farmacéuticos de acuerdo con la norma ISO 11737.

ABSTRACT

The international standardization rules provide an overview explaining about various topics, for this work will be used to guide the International Standard ISO 11737 indicating its content processes can be used to validate the sterilization process used in an institution or laboratory [7].

Bioburden found not only may result from defects in the sterilization process, also depends on factors such as the manufacturing of the raw material components, assembly processes, manufacturing environment, compressed gases, water, lubricants, cleaning processes product and packaging [7].

The methodology proposed in this project was to evaluate the 1% rubber plugs had as sample size (10 bags of 500 units), which will be introduced in bottles containing thioglycolate for the growth of mesophilic and Casoy for fungi and yeasts. The aim of this work is to standardize the microbiological method to determine the microbial load present in the rubber stoppers for pharmaceutical packaging in accordance with ISO 11737.