



ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización y determinación de la termorresistencia de contaminantes microbianos en una planta de fabricación de parenterales

Characterization and thermoresistant determination of microbial pollutant in a parenteral manufacturing industry

Yaidelys Iglesias-Torrens^{1*}, Laidy I. Ortiz-Rodríguez¹ y Marcia Rojas-Badía²

¹ Departamento de Control de la Calidad. Laboratorios Farmacéuticos AICA. La Habana, Cuba

² Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

* Autor para correspondencia:
aidat@aica.cu

RESUMEN

La fabricación de productos estériles está sujeta al cumplimiento de estrictas regulaciones. La biocarga presente en los productos y en el entorno de fabricación debe tener bajos valores para garantizar un alto nivel de seguridad del producto terminado, independientemente del tipo de producto y del proceso de esterilización al que son sometidos, por lo que los objetivos de este trabajo fueron el aislamiento, la caracterización y la determinación de la termorresistencia de las cepas halladas en las fuentes de contaminantes de una planta de producción. Se tomaron muestras de diferentes fuentes y se analizaron mediante técnicas de filtración, de muestreos volumétricos, de superficies y de análisis de productos no estériles. Para la clasificación se utilizaron pruebas morfológicas-tintoriales y bioquímicas. Se evaluó la termorresistencia de las cepas a 100°C mediante un reto por temperatura. Se obtuvo un total de 106 muestras contaminadas, de las cuales 98 se procesaron y se obtuvieron 146 aislamientos. La mayoría se clasificó como microorganismos Gram positivos, aislados fundamentalmente de muestras ambientales. Se identificaron 11 géneros microbianos, dentro de los cuales predominaron los géneros *Deinococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*. Del total de aislamientos, 86 mostraron termorresistencia y la mayoría provinieron de fuentes ambientales. El 93% de las cepas termorresistentes fueron Gram positivas y el género *Bacillus* mostró la mayor termorresistencia. La mayor fuente de contaminación en la planta de producción de parenterales proviene de microorganismos del ambiente de fabricación, los cuales son en su mayoría Gram positivos y termorresistentes.

Recibido: 2015-10-29

Aceptado: 2015-04-09

Palabras clave: Microorganismos contaminantes, fabricación de parenterales, termorresistencia

ABSTRACT

The manufacture of sterile products must comply strict regulations. The bioburden present in the products and in the manufacturing environment should have low values in order to ensure the high level of safety of the finished product, regardless of the type of product and the sterilization process to which they are subjected. So, the aims of this work were the isolation, characterization and determination of the thermoresistance of the strains found in the pollutant sources of a manufacturing plant. Samples were collected from different sources and analyzed by filtering techniques, volumetric sampling and surfaces and non-sterile products analysis. To identify, morphological-staining and biochemical tests were used. Thermoresistance of the strains at 100°C was evaluated by challenging temperature. A total of 106 contaminated samples were obtained, of which 98 were processed and 146 isolates were obtained. Most were classified as Gram positive bacteria, isolated mainly from environmental samples. Samples were identified and 11 microbial genera were obtained, among which predominated *Deinococcus*, *Corynebacterium* and *Propionibacterium* genera. Of all isolates, 86 showed thermoresistance and most of these were from environmental sources. The 93% of thermoresistant strains were Gram positive bacteria, where *Bacillus* genera showed the higher thermoresistant. It was shown that the major source of contamination in a parenteral manufacturing industry comes from microorganisms of environment, which are mostly Gram positive and thermo-resistant.

Keywords: Pollutant microorganisms, parenteral manufacturing, thermoresistance

INTRODUCCIÓN

Las plantas industriales que manufacturan productos farmacéuticos deben operar bajo estrictas condiciones de limpieza y sanidad, las cuales se establecen por entidades regulatorias a nivel mundial. En particular, la fabricación de productos estériles está sujeta a requisitos especiales para minimizar los riesgos de contaminación microbiana, de partículas y de pirógenos (ISO, del inglés *International Standard Organization-17665*, 2007; Li *et al.*, 2014).

La Garantía de Calidad reviste una importancia especial por lo que se deben seguir estrictamente los métodos de preparación así como los procedimientos establecidos y validados (PDA, del inglés *Parenteral Drug Association*, 2007; Cundell, 2014).

Uno de los principales factores a controlar es el entorno microbiológico. Los niveles de microorganismos totales asociados a materiales, materias primas, productos en proceso, envases primarios previos a su esterilización (biocarga) deben ser controlados y monitoreados con el fin de mantener conteos bajos de biocarga en el producto antes de ser sometido al proceso de esterilización (Mohr, 1997; Eaton *et al.*, 2014).

El perfil microbiológico de una planta farmacéutica es variado. Se destacan géneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium* y *Micrococcus*, los cuales se aíslan de los productos fabricados, del sistema de clima, de agua, del equipamiento y del personal que labora en

las instalaciones. En las plantas farmacéuticas existe poca disponibilidad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, pero esto no impide la sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos (Guizelini *et al.*, 2012).

Se considera un ambiente de producción no contaminado cuando el monitoreo de cada una de sus áreas muestra resultados que cumplen con los límites establecidos (CECMED, 2006).

La esterilidad o carencia total de microorganismos es uno de los requerimientos fundamentales para los productos terminados y su correcto procesamiento en las etapas iniciales de la producción es clave en la reducción de la biocarga (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*, 2004; Schnetzinger *et al.*, 2013). Existen diversos métodos para alcanzar este requerimiento, entre los cuales se destacan los métodos físicos (calor, radiaciones), los químicos y los mecánicos (filtración) (Yoon *et al.*, 2012). Durante décadas se han usado dos esquemas diferentes en la esterilización de los productos terminados: el procesamiento aséptico y la esterilización por calor húmedo.

El procesamiento aséptico se utiliza en aquellos productos asépticos termolábiles debido a que la destrucción de la biocarga no implica la degradación del producto (ISO-17665, 2007; PDA, 2007). Este proceso se apoya en la separación de los potenciales contaminantes microbianos del producto a través de la filtración con un filtro estéril de tamaño de poro de 0,22 µm (o

menor). Estos filtros pueden eliminar la mayor parte de las bacterias y los hongos, pero no todos los virus o micoplasmas (FDA, 2004). El proceso consta de la esterilización de forma independiente de los componentes de empaque y el producto, por lo que es muy importante el control del ambiente.

La esterilización por calor húmedo se basa en un proceso de esterilización letal, donde se aplica un ciclo de 121°C durante 15 minutos a la forma farmacéutica completamente ensamblada (Keene, 1998). En el caso de los productos termosensibles, se aplica este mismo tipo de esterilización, pero a menores temperaturas durante periodos de tiempo más largos (Li *et al.*, 1998).

Para que un producto sea clasificado como estéril, se debe garantizar que todas las etapas del proceso de producción se realizaron de forma correcta y que el proceso de esterilización esté validado (Rahe, 2013).

En Cuba, los Laboratorios Farmacéuticos AICA, producen soluciones parenterales de pequeño volumen para uso humano, lo cual está dirigido a garantizar la demanda nacional y la exportación; y cumplen los requerimientos de las Buenas Prácticas de Fabricación establecidas internacionalmente para esta forma farmacéutica, con calidad y eficiencia (USP, del inglés *United States Pharmacopeia-31*, 2012). La empresa cuenta con un total de 93 productos registrados que se utilizan en el Sistema Nacional de Salud, dentro de los cuales 20 son termosensibles. Para la esterilización de estos últimos no se aplica el procesamiento aséptico debido a que estos productos presentan la capacidad de soportar ciclos de esterilización terminal a menores temperaturas, pero con periodos de tiempos más largos.

Para lograr la efectividad de este proceso es necesario determinar la termorresistencia de las cepas aisladas del entorno productivo, por lo que los objetivos de este trabajo fueron aislar y caracterizar las bacterias presentes en el entorno de fabricación de la planta farmacéutica de parenterales de los Laboratorios AICA, así como determinar su termorresistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra y aislamiento de microorganismos contaminantes en la planta de producción de parenterales

El estudio se realizó en la planta de producción de parenterales de los Laboratorios farmacéuticos AICA

en el período comprendido entre junio de 2012 y diciembre de 2013. Las muestras procedieron de diferentes fuentes tales como materias primas (agua y materias primas de productos), entorno de fabricación (aire, superficies de equipos y personal de la instalación), productos terminados antes del proceso de esterilización (Dextrosa 5%, Furosemida-20, Cimetidina-300, Pentoxifilina, Gluconato de calcio, Gluconato de potasio y Sulfato de magnesio) y del proceso de llenado aséptico.

De las 106 muestras de las diferentes fuentes se desecharon ocho por mostrar contaminación externa al sitio de muestreo. El número de muestras a partir de las diferentes fuentes de muestreo se presenta en la figura 1.

En el caso de las muestras de agua, se tomaron directamente de los puntos de muestreo. Se colectaron 500 mL en frascos ISO estériles, de los cuales se filtraron 100 mL por triplicado en una membrana de nitrato de celulosa con porosidad de 0,45 µm. Después del filtrado se colocaron las membranas en cartones nutrientes de medio Estándar, Ceftriaxona y Endo y se incubaron a 35°C durante 48h. El muestreo de las materias primas se realizó a cada lote. Se tomaron 10 g de materia prima de forma aséptica, se colocaron en un frasco con Caldo Triptona Soya (TSB, del inglés *Tryptone Soy Broth*) y se incubó a 35°C durante 24 h. Se procedió según lo establecido en el PNO-CC7-001: "Análisis microbiológico del agua por el método de filtración por membrana, de la empresa Laboratorios AICA".

Las muestras del entorno de fabricación se tomaron según las diferentes técnicas establecidas en la farmacopea americana (1116, USP- 35). Para el muestreo del aire se utilizó el equipo MAS-100. La placa de contacto (rodac) en la que se depositó el aire filtrado se incubó a 35°C durante 72 h. Para el muestreo de superficie de equipos se colocó una placa Petri abierta por un periodo de 4h y se incubó a 35°C durante 72 h. Por último, para el muestreo del personal se utilizaron placas rodac, las cuales se pusieron en contacto con determinadas zonas del vestuario de los operarios y se incubaron a 35°C durante 72 h.

Para el análisis de los productos terminados, el muestreo depende de si es un producto aséptico o no. Para el caso del producto aséptico (Cimetidina-300) se tomó la muestra en un frasco ISO estéril antes de la filtración esterilizante. Para los productos no asépticos (Dextrosa-5%, Gluconato de calcio, Gluconato de potasio, Sulfato

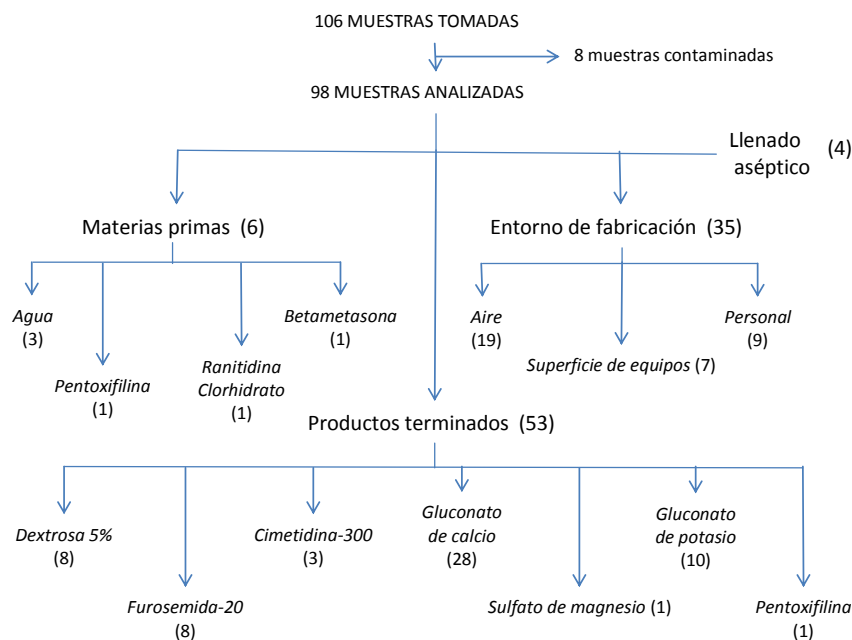


Figura 1. Muestras tomadas agrupadas según las fuentes en la planta de producción de parenterales de los Laboratorios AICA. Se relacionan las muestras contaminadas y las analizadas según la fuente de contaminación.

Figure 1. Samples grouped according the sources in the parenteral production plant of AICA Laboratories. Contaminated and analyzed samples by the polluted source are related.

de magnesio y Pentoxifilina) y del termosensible (Furosemida-20, producto aséptico pero que soporta cierto grado de temperatura sin afectar la integridad del producto) se tomaron las muestras en las ampollitas una vez iniciado el proceso de llenado. Las muestras se filtraron en membranas de nitrocelulosa, las cuales se colocaron sobre una placa Petri con medio de cultivo Agar Triptona Soya (TSA, del inglés *Tryptone Soy Agar*) y se incubaron a 35°C durante 72h.

En el caso de las muestras de llenado aséptico, se procedió de forma igual a lo descrito para el caso de producto terminado no aséptico debido a que este tipo de muestra consiste en incorporar medio de cultivo TSB a las ampollitas. Las placas se incubaron a 35°C durante 72h. Se procedió según lo establecido en el PNO-CC7-020: "Determinación de la carga microbiana, de la empresa Laboratorios AICA".

De las 106 fuentes muestreadas se descartaron las que poseían evidencias de contaminación por manipulación, al resto se les realizó un subcultivo en medio TSA para obtener colonias aisladas y un cultivo puro.

Caracterización hasta nivel de género

Para la caracterización hasta nivel de género de las cepas aisladas se realizó la tinción de Gram y poste-

riormente, según los diferentes grupos de bacterias, se procedió a la identificación mediante las pruebas bioquímicas que a continuación se relacionan (Holt *et al.*, 1994): actividad de la enzima catalasa, presencia de la enzima citocromo oxidasa, oxidación fermentación (OF), utilización de la glucosa, crecimiento en aerobiosis - anaerobiosis (medio Tioglicolato), motilidad, producción de indol y sulfhídrico (Medio SIM), utilización de la glucosa y la lactosa (Medio Kligler), presencia de esporas (tinción verde malaquita), utilización del citrato como única fuente de carbono, hidrólisis del almidón, actividad de la enzima ureasa y crecimiento en presencia de NaCl 6,5 %.

Determinación de la resistencia a altas temperaturas

Con el objetivo de conocer la termorresistencia de los microorganismos encontrados en la planta de parenterales se procedió a retar a la temperatura de 100°C cada aislamiento microbiano identificado. Para esto se tomó una colonia del microorganismo y se sembró por agotamiento en una placa Petri con TSA. De esta placa se tomó un cuarto del crecimiento en césped (se garantiza una viabilidad de 10^7 - 10^8) y se introdujo en un tubo con 4 mL de medio de cultivo TSB. Posteriormente se dispensó 1 mL de esta solución en un

tubo estéril correspondiente a cada tiempo (5, 10, 20 y 30 minutos) durante el cual se retó a la temperatura en un baño termostático de agua. Posteriormente, se filtró la solución en una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó en una placa Petri con TSA durante 24 h a 35°C.

El criterio de positividad de termorresistencia consistió en la observación de crecimiento microbiano en la placa Petri después de transcurrido el tiempo de incubación y en corroborar las características morfológico-tintoriales de la cepa analizada.

RESULTADOS

Aislamientos

De las 98 muestras analizadas se obtuvo un total de 146 aislamientos distribuidos en todos los tipos de muestras analizadas (Fig. 2 A). El mayor aporte de aislados contaminantes se obtuvo a partir del entorno de fabricación. De cada tipo de muestra se obtuvieron diferentes distribuciones de los contaminantes bacterianos (Fig. 2 B).

En el grupo de las materias primas se apreció una baja cantidad de contaminantes, solamente uno y cuatro aislados por muestra. En el entorno de fabricación la mayor cantidad de contaminantes se obtuvo en los muestreos del aire con 64 aislamientos en las

19 muestras tomadas, seguido por los 18 aislamientos encontrados en el personal en las nueve muestras tomadas. Sin embargo, estos resultados contrastan con solo dos aislados obtenidos a partir de los siete muestreos en la superficie de los equipos. En el grupo de los productos terminados en la mayoría se mantiene una relación 1:1 entre la cantidad de muestras y la cantidad de contaminantes obtenidos.

Mediante el empleo de la tinción de Gram se clasificaron 109 cepas como Gram positivas y 37 Gram negativas. Dentro de las Gram positivas 56 tienen forma bacilar, 37 son cocos y 16 bacilos esporulados. Entre las Gram negativas 30 cepas fueron bacilos y las siete restantes fueron cocos.

De los 146 aislamientos, nueve procedieron de las materias primas, 84 del entorno de fabricación, cuatro del llenado aséptico y 49 de los productos terminados antes del proceso de esterilización (Fig. 2).

Dentro de las materias primas, se analizaron la Ranitidina Clorhidrato y la Betametasona (asépticos). Para la primera solo se observó la presencia de bacilos Gram positivos esporulados pertenecientes al género *Bacillus* y en la segunda además de estos, que representaron un 70%, se aislaron bacilos Gram negativos pertenecientes al género *Acinetobacter*. En el caso de la materia prima Pentoxifilina, solo se obtuvo un aislamiento perteneciente al género *Citrobacter*, y en los

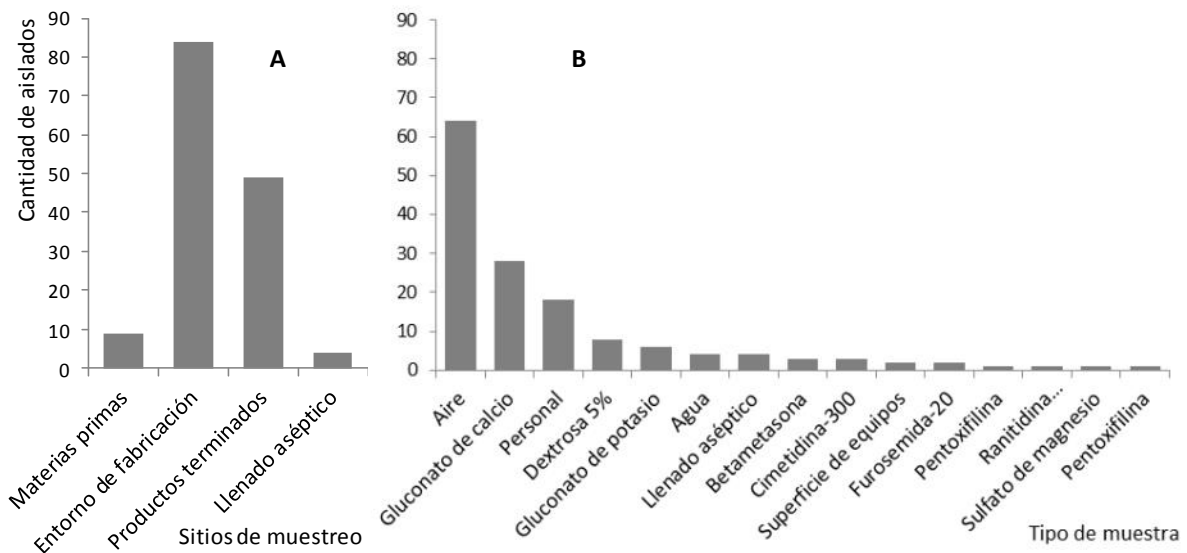


Figura 2. Distribución de los aislados obtenidos en las diferentes fuentes contaminantes (A) y por tipo de muestra (B).

Figure 2. Distribution of isolates from different pollution sources (A) and type of sample (B).

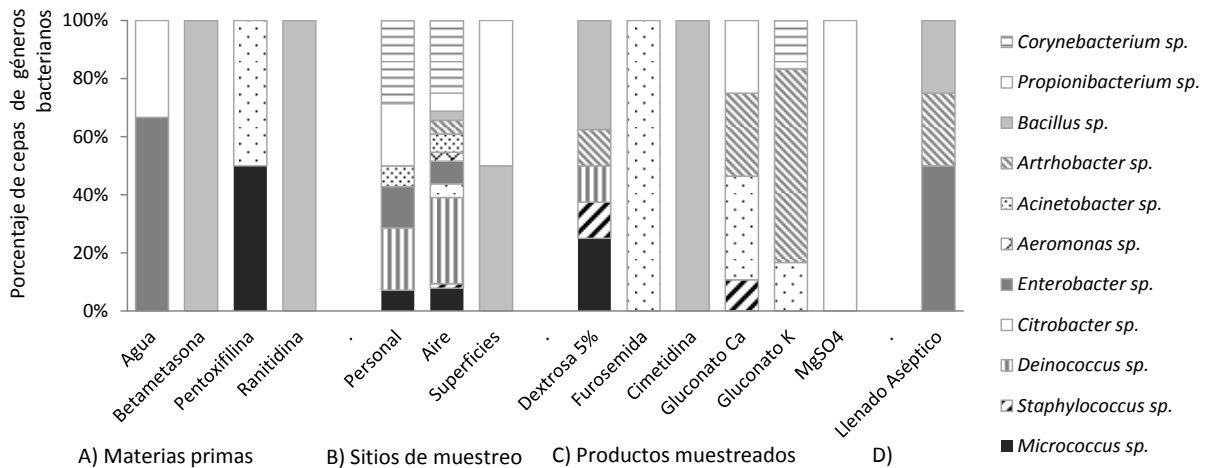


Figura 3. Presencia de géneros bacterianos en las diferentes fuentes analizadas A: Materias primas, B: Entorno de fabricación, C: Productos terminados, D: Llenado aséptico.

Figure 3. Bacterial genera in different sources analyzed A: Raw materials, B: manufacturing environment, C finishing products, D: Aseptic filling.

análisis de los diferentes muestreos de agua se identificaron tres géneros de microorganismos: *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Propionibacterium* (Fig. 3A).

En el entorno de fabricación, fue donde se obtuvieron más aislamientos de microorganismos. Los resultados de muestreo del aire reportaron 64 aislamientos y se observó crecimiento de los 11 géneros identificados en este estudio, donde *Deinococcus* y *Corynebacterium* fueron los más representados (30% y 25%, respectivamente). El muestreo de la superficie de los equipos mostró dos aislamientos y solo se identificaron los géneros *Bacillus* y *Propionibacterium*. Para el caso del personal se obtuvieron 18 aislamientos y se identificaron seis tipos de contaminantes. Los géneros *Deinococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* fueron los predominantes, pero se encontraron además microorganismos pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Micrococcus* y *Acinetobacter* (Fig. 3).

Para el caso del muestreo de los productos terminados antes del proceso de esterilización, los aislamientos, en la mayoría de ellos, fueron bajos; excepto para el Gluconato de calcio. El producto que mayor número de contaminantes presentó fue la Dextrosa 5%. En el caso del Gluconato de calcio se obtuvieron 28 aislamientos, pero el 89% de los contaminantes estuvo ubicado en los géneros *Citrobacter*, *Arthrobacter* y *Propionibacterium* (36%, 28% y 25%, respectivamente); el 11% restante perteneció al género *Staphylococcus*.

En el caso del Gluconato de potasio se identificaron tres géneros contaminantes, de los cuales *Arthrobacter* y *Citrobacter*, también se encontraron en el Gluconato de calcio. En ambos productos, estos géneros fueron los más abundantes. El otro microorganismo contaminante identificado en el producto Gluconato de potasio perteneció al género *Corynebacterium*. Sin embargo, la Dextrosa 5%, que solo presentó ocho aislamientos, tuvo una mayor diversidad dentro de sus contaminantes; donde destacaron los géneros *Bacillus* y *Micrococcus* como los más abundantes (40% y 30%, respectivamente), mientras que los géneros *Staphylococcus*, *Deinococcus* y *Arthrobacter* representaron cada uno un 10% del total de contaminantes. Para el caso del producto termosensible Furosemida-20, la Cimetidina-300, y el Sulfato de Magnesio en sus correspondientes aislamientos se observó un tipo de contaminante, perteneciente a los géneros *Citrobacter*, *Bacillus* y *Propionibacterium*, respectivamente (Fig. 3).

En los aislamientos procedentes de las muestras tomadas en el Llenado Aséptico se observaron tres tipos de contaminantes, donde el género *Enterobacter* fue el predominante al encontrarse en dos de los cuatro aislamientos realizados. Los otros dos contaminantes pertenecieron a los géneros *Arthrobacter* y *Bacillus* (Fig. 3).

Caracterización de los aislados

Para la identificación de las cepas aisladas se evaluó su respuesta a las diferentes pruebas bioquímicas. Como los resultados de las pruebas fueron similares en varias cepas, esto permitió que los 146 aislamientos se agruparan en 11 grupos. Esto posibilitó la identificación de 11 géneros de microorganismos en las diferentes fuentes del estudio. Solo se pudo clasificar hasta el nivel de género debido a que las pruebas bioquímicas utilizadas no permitieron la identificación hasta nivel de especie. Los géneros identificados en este estudio fueron *Bacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Propionibacterium*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Deinococcus*, *Aeromonas* y *Corynebacterium* (Tabla 1).

Resistencia a la temperatura

Las 146 cepas obtenidas se sometieron al reto de resistencia a la temperatura de 100°C. Del total de cepas 86 mostraron resistencia a la temperatura, de las cuales 23 fueron resistentes durante los 30 minutos de exposición. De estas 23 cepas, 16 pertenecieron al género *Bacillus* y 7 al género *Arthrobacter*. Ninguna otra cepa fue capaz de resistir ni a los 20 ni a los 30

minutos de exposición. En las cepas de los géneros *Enterobacter*, *Propionibacterium* y *Acinetobacter* no se observó viabilidad en ninguno de los tiempos de exposición. Por su parte todas las cepas de *Staphylococcus* y *Micrococcus* presentaron la capacidad de resistir esta temperatura durante 5 minutos y las del género *Aeromonas* durante 10 minutos. Sin embargo, en las cepas de *Deinococcus*, *Citrobacter* y *Corynebacterium* se observó una resistencia variable en dependencia de la cepa analizada. En el caso del género *Deinococcus*, en 22 de sus aislamientos se pudo observar termorresistencia durante los 10 minutos de exposición, mientras en la otra cepa no se observó termorresistencia. En 4 cepas del género *Citrobacter* y 17 del género *Corynebacterium*, se observó termorresistencia a los 5 minutos de exposición, mientras que en las otras 13 y 3, respectivamente nunca se evidenció la resistencia a la temperatura. Por su parte en los aislamientos del género *Arthrobacter* fue donde se observó mayor variabilidad en el comportamiento de la termorresistencia, siete cepas mostraron total resistencia a la temperatura de 100°C, tres fueron resistentes durante 10 minutos y en las restantes ocho no se pudo observar viabilidad (Fig. 4).

Tabla 1: Grupos de aislamientos microbianos clasificados según las diferentes pruebas bioquímicas.

Table 1. Microbial isolates groups classified according to different biochemical tests.

| GRUPOS DE AISLAMIENTOS | | | | | | | | | | | |
|------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|---------------|---------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| Pruebas | G1 (16) | G2 (9) | G3 (18) | G4 (5) | G5 (17) | G6 (17) | G7 (11) | G8 (7) | G9 (23) | G10 (2) | G11 (21) |
| 1 | Bacilos Gram+ | Cocos Gram+ | Bacilos Gram+ | Cocos Gram+ | Bacilos Gram- | Bacilos Gram+ | Bacilos Gram- | Cocos Gram- | Cocos Gram+ | Bacilos Gram- | Bacilos Gram+ |
| 2 | No | No | No | Amarillo | No | No | No | No | Rosado | No | No |
| 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| 5 | Oxidativa | Oxidativa | Oxidativa | Ferment. | Ferment. | Ferment. | Oxid-Ferm. | Oxid-Ferm. | No degrada | Ferment. | Ferment. |
| 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 7 | Aerobio | Aerobio | An. Facult. | An. Facult. | An. Facult. | An. Facult. | Aerobio | Aerobio | Aerobio | An. Facult. | An. Facult. |
| 8 | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + | - |
| 9 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | Glucosa | No utiliza | No utiliza | Glucosa | Gluc+gas | Glucosa | Gluc+gas | No utiliza | No utiliza | Gluc+gas | Glucosa |
| 11 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - |
| 13 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + | + |
| Género | B | M | Ar | S | Ci | P | E | Ac | D | Ae | Co |

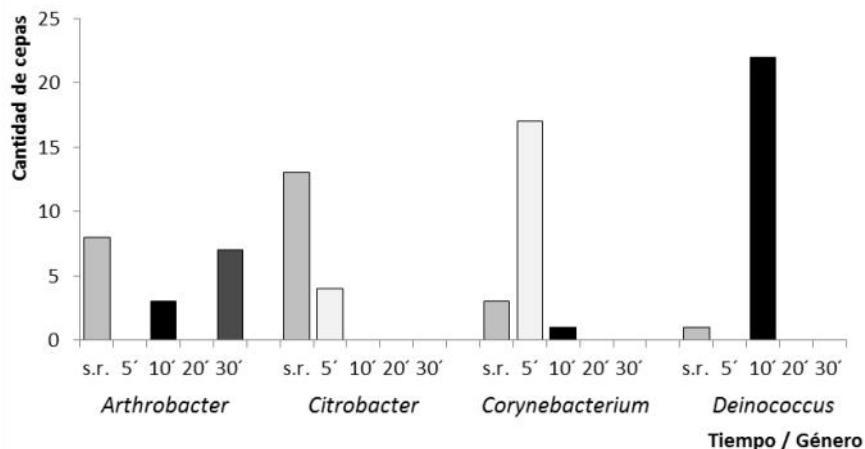
Pruebas: 1: Características morfo-tintoriales, 2: Presencia de pigmento, 3: Actividad de la enzima catalasa, 4: Presencia de citocromo oxidasa, 5: Oxidación-fermentación, 6: Fermentación de la glucosa, 7: Aerobiosis-Anaerobiosis, 8: Motilidad, 9: Indol – sulfídrico, 10: Utilización de la glucosa y lactosa, 11: Presencia de esporas, 12: Utilización del citrato, 13: Hidrólisis del almidón, 14: Actividad de la enzima ureasa, 15: Crecimiento en NaCl 6,5%

Símbolos: + positivo; - negativo; Ferment.: fermentativa; Oxid-Ferm.: Oxidativa fermentativa; An.Facult.: anaerobio facultativo; Gluc+gas: glucosa más gas

Géneros: Ac: *Acinetobacter*, Ae: *Aeromonas*, Ar: *Arthrobacter*, B: *Bacillus*, Ci: *Citrobacter*, Co: *Corynebacterium*, D: *Deinococcus*, E: *Enterobacter*, M: *Micrococcus*, P: *Propionibacterium*, S: *Staphylococcus*

Figura 4: Cantidad de los aislados sin resistencia y resistentes a la temperatura de 100°C durante diferentes tiempos (5, 10, 20 y 30 minutos). (s.r.: sin resistencia)

Figure 4. Number of isolates without resistant and resistant to temperature of 100°C for different times (5, 10, 20 and 30 minutes).



Del total de cepas resistentes a la temperatura de 100°C, 36 fueron cocos Gram positivos, 28 bacilos Gram positivos, 16 bacilos Gram positivos esporulados y seis bacilos Gram negativos. Por tanto, de los 109 aislamientos Gram positivos del estudio, 70 (64%) lograron resistencia térmica y de los 37 aislamientos Gram negativos, solo seis (16%) mostraron resistencia.

De las 86 cepas resistentes, se encontraron 3 en la fuente de materias primas, 61 en las muestras del entorno de fabricación, 20 en el caso de los productos terminados antes del proceso de esterilización y 2 en el llenado aséptico. Esto representa un 33, 72, 41 y 50% del total de muestras las fuentes analizadas, respectivamente.

Los microorganismos Gram positivos mostraron un mayor porcentaje de sobrevivencia ante el estrés térmico al compararlos con los microorganismos Gram negativos. El 93% del total de cepas resistentes fueron microorganismos Gram positivos y, solamente un 7% fueron microorganismos Gram negativos perteneciente a los géneros (*Aeromonas* y *Citrobacter*) cuyas cepas lograron sobrevivir solamente durante 5 minutos.

DISCUSIÓN

La producción de parenterales debido a su forma de administración endovenosa requiere un alto grado de esterilidad, por lo que es necesario que en su proceso de producción exista un estricto control de la contaminación proveniente de las fuentes de materias primas y del ambiente productivo (von Woedtke, 2008). En este tipo de ambiente la contaminación proviene fundamentalmente de la superficie de los equipos, del personal que labora en la instalación y del aire.

En este estudio se demostró que la mayoría de los aislamientos provinieron del muestreo del aire y del personal de la instalación como se ha reportado anteriormente para otras industrias de este tipo (de la Rosa *et al.*, 2002; Lakshmana *et al.*, 2013), además que en estudios realizados por la FDA se ha encontrado que el 80% de la contaminación existente en estas zonas se debe al personal (FDA, 2004). Se debe destacar que en nuestro trabajo no se obtuvo ninguna muestra con crecimiento fúngico, a pesar de que el medio de cultivo TSA permite el crecimiento de hongos y levaduras; durante el período de estudio no se encontró crecimiento fúngico en estas placas con TSA en ningún punto de muestreo. El sistema de climatización debe mantener bajos niveles de humedad relativa y de este modo impedir el crecimiento fúngico (Cavallo *et al.*, 2013), esta puede ser la causa de que no se detectó en el estudio esta presencia además del tratamiento de las áreas con agentes de limpieza probados para eliminar este tipo de crecimiento microbiano, los cuales resultan efectivos debido a la baja concentración en que se encuentran los hongos en estos ambientes, al tipo de superficie en que son aplicados y al tiempo de acción prolongado que tienen los desinfectantes (Rutula, 1998; Xu *et al.*, 2014). La mayoría de los aislamientos encontrados fueron bacilos y cocos Gram positivos, lo cual se ha encontrado en otros estudios realizados en entornos similares de producción (Delgado *et al.*, 2005; Sutton, 2010) y donde se ha observado un predominio de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* (Ashour *et al.*, 2011). Otros autores informan que en el muestreo de las plantas de producción existe una prevalencia de las bacterias Gram positivas pertenecientes a los géneros

Arthrobacter, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus*; datos que están en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo (Underwood, 1992; de la Rosa *et al.*, 2000; Caorsi *et al.*, 2011). En el caso de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, y *Deinococcus*, se conoce que forman parte de la microbiota normal de la piel del ser humano (Murray *et al.*, 2009), por lo que pueden pasar al ambiente debido a las actividades realizadas en el entorno de producción por el personal que ahí labora. La capacidad fotoprotectiva de los pigmentos carotenoides podría explicar la abundancia del género *Micrococcus* que es predominante en este tipo de ambiente. Estos pigmentos protegen a los microorganismos de las radiaciones de la luz ultravioleta utilizada como técnica de desinfección en las áreas y superficies de producción (Mandal y Brandl, 2011). Este método de eliminación de contaminantes podría no resultar efectivo frente a este género debido a su dosis de uso, la cual se considera baja (por debajo de 240 nm de longitud de onda) (Chang *et al.*, 1985; Kujundzic *et al.*, 2006). Esta dosis es la que frecuentemente se usa para esta técnica de desinfección.

En el caso de los bacilos Gram positivos esporulados, su presencia en este ambiente fue menor que la esperada, en comparación con lo observado en otros géneros microbianos que no presentan estructuras de resistencia que le garantizan una mayor sobrevivencia a las condiciones de limpieza de las áreas de producción como han demostrado Mahfoudh *et al.*, 2010.

En el caso de las bacterias Gram negativas, se aislaron de muestras de agua y del entorno de fabricación principalmente. Mostraron un reducido número en la cantidad de aislamientos con respecto a las bacterias Gram positivas. Esto puede deberse a su menor sobrevivencia en estos ambientes, debido a que son muy sensibles a la desecación, la temperatura y la acción de los desinfectantes (Sakudo y Shintani, 2011).

Algunos microorganismos han creado adaptaciones especializadas que favorecen su sobrevivencia y su dispersión en la atmósfera de la planta de producción. El transporte se realiza sobre partículas de polvo, piel, fibras de la ropa, en gotas de saliva eliminadas al toser, estornudar o hablar (de la Rosa *et al.*, 2000).

Los contaminantes hallados en las muestras de materia prima de producto son habituales en este tipo de muestra (Pandey *et al.*, 2013) debido a que estos microorganismos son fuente contaminante del ambiente

por lo que las condiciones de almacenamiento y las características de producción facilitan su contaminación. En el caso del agua empleada como materia prima se encontraron tres géneros bacterianos, dos de los cuales se han observado frecuentemente en la microbiota de la piel y el tercero, *Enterobacter*, constituye un indicador de posible contaminación de origen fecal del agua (Jiménez, 2004), la que no se logra eliminar debido a errores en las técnicas de sanitización del sistema de agua (USP-33, 2010).

Los géneros aislados en las 146 cepas estudiadas están en correspondencia con una investigación realizada anteriormente en un ambiente con características similares al de este estudio (Jiménez, 2004); donde se refleja la diversidad microbiana presente en las materias primas, el sistema de clima, el equipamiento y el personal. Este último constituye una fuente de contaminación a destacar en este ambiente productivo.

La Dextrosa 5% fue el producto terminado de mayor diversidad de contaminantes seguido del Gluconato de Calcio y de Potasio. La Dextrosa 5% es un monosacárido muy soluble en agua (USP-33, 2010) cuyo componente fundamental es la D-glucosa, monosacárido principal en el metabolismo de estos géneros de bacterias contaminantes. Las transformaciones de la glucosa no ocurren en un solo paso, sino que, por el contrario, se forman varios productos intermedios que en muchas ocasiones no tienen una función específica a no ser la de formar parte de lo que se conoce como vía metabólica (Bhakdi *et al.*, 2012). Los Gluconatos son productos ricos en iones, cuya presencia justifica la fácil proliferación de microorganismos antes del proceso de esterilización. En el resto de los productos la presencia de contaminantes fue muy baja debido a que por su composición química es más difícil la sobrevivencia de más géneros de microorganismos.

Los bacilos Gram positivos esporulados del género *Bacillus*, y los bacilos Gram positivos pleomórficos denominados "corineformes" pertenecientes a los géneros *Arthrobacter* y *Corynebacterium* demostraron en este estudio resistencia a la temperatura de 100°C, lo cual puede deberse en el primero a la presencia de esporas (Melly *et al.*, 2002; Reineke *et al.*, 2011; Madigan *et al.*, 2012), y en los restantes por la composición de su pared celular, rica en lípidos, lo que le confiere a los tres géneros una alta sobrevivencia ante el estrés térmico. La pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano, además de dos clases de ácidos

teicoicos: anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglucano (también conocido como mureína). Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está formada de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido. La clave para la termorresistencia es el peptidoglucano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mayor proporción que las Gram negativas (Visweswaran *et al.*, 2011).

En el caso de las bacterias Gram negativas su reducido número después de ser sometidas al reto por temperatura puede deberse principalmente a la composición de su pared, lo cual las hace muy susceptibles a los efectos del estrés térmico. Como demuestran los resultados, los microorganismos Gram positivos fueron más resistentes al reto por temperatura, lo cual se corresponde con lo informado en una investigación anterior (Jiménez, 2004).

Este trabajo sienta las bases para la evaluación de la efectividad del proceso de esterilización de los productos parenterales termosensibles, estudio necesario para el cumplimiento de las buenas prácticas de producción farmacéutica y primero realizado en el país, siguiendo las normativas de la Asociación de Drogas Parenterales en 2007. Se demuestra que en una planta de producción de productos parenterales la mayoría de los aislamientos microbianos proceden del entorno de fabricación y no son termorresistentes. La prevalencia de estos microorganismos en los productos analizados y su respuesta a la temperatura demuestran que estos no determinan la esterilidad del producto final, ya que se eliminan al ser sometidos a un proceso de esterilización. Además se evidencia que la termorresistencia es predominante en las cepas Gram positivas.

LITERATURA CITADA

- Ashour, M. S. Mansy y M. E. Eissa (2011) Microbiological environmental monitoring in pharmaceutical facility. *Egyptian Acad. J. Biol. Sci.* 3 (1): 63-74.
- Bhakdi, S., I. Krämer, E. Siege; B. Exner (2012): Use of quantitative microbiological analyses to trace origin of contamination of parenteral nutrition solutions. *Medical Microb. Immunol.* 2: 231-237.
- Cavallo, M, S. Andreoni, M. Martionatti, M. Rinaldi, *et al.* (2013) Monitoring environmental *Aspergillus spp.* Contamination and meteorological factors in a haematological unit. *Mycopathologia* 176:387-394.
- Caorsi, B., A. Sakurada, M. Ulloa, M. Pezzani *et al.* (2011) Calidad microbiológica del aire de una unidad de preparados farmacéuticos estériles. *Rev. Chilena Infectol.* 28(1): 14-28.
- CECMED (2006) Clasificación y monitoreo de áreas limpias y dispositivos de aire limpio. Regulación 16-2006: Directrices sobre buenas prácticas para la fabricación de productos farmacéuticos. Anexo 4.
- Chang, J., S. Ossoff, D. Lobe, M. Dorfman *et al.* (1985) UV inactivation of pathogenic and indicators microorganism. *Appl. Environ. Microb.* 49(6): 1361-1365.
- Cundell, A. (2014) Justification for the use of aseptic filling for sterile injectable products. *PDA Journal Pharm. Sci. Techn.* 68 (4):323-32.
- de la Rosa, M., C. Ullan y M.A. Mosso (2002) El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observ. Medio Amb.* 5: 375-402.
- de la Rosa, M., C. Ullan, M. Prieto y M.A. Mosso (2000) Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica. *An. Real Acad. Farm.* 66: 213-228.
- Delgado, M., L. Escamilla, A. Pérez y J. Arias (2005) Determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos estériles a base de antibióticos β -lactámicos. *Rev. Fac. Cien. Pontificia Univ. Javeriana* 9(2): 23-33.
- Eaton, T., C. Wardle y W. Whyte (2014) Use of a real-time microbial air sampler for operational cleanroom monitoring. *PDA J. Pharm. Sci. Techn.* 68(2):172-84.
- Food and Drug Administration (2004) Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing—Current Good Manufacturing Practice.
- Guizelini, B., L. Vandenberghe, S. Sella y C. Soccol (2012) Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. *Arch. Microb.* 194 (12):991-9.
- Holt, J., N. Krieg, P. Sneath, J.T. Staley *et al.* (1994) En: William R Hensley (Ed.) *Bergey's manual of determinative bacteriology.* pp. 31-853.
- International Standard Organization-17665 (2007) Esterilización de productos sanitarios. Calor húmedo. Parte 1: Requisitos para el desarrollo, validación y control de rutina de un proceso de esterilización para productos sanitarios.
- Jiménez, L. (2004) Microorganisms in the environment and their relevance to pharmaceutical progress. *Drugs Pharm. Sci.* 142:103-110.
- Kujundzic, E., F. Matakah, C.J. Howard y M. Hernandez (2006)

- UV air cleaners and upper-room air ultraviolet germicidal irradiation for controlling airborne bacteria and fungal spores. *J. Occup Environ. Hygiene* 3 (10):536-46
- Lakshmana, P. y T. Suriyaprakash (2013) Impact of Microbial Surface Contamination and Effective Environment Monitoring System in Pharmaceutical Manufacturing. En: Thirumurugan, R. (Ed). *Developments in Surface Contamination and Cleaning: Contaminant Removal and Monitoring*. pp.165-190.
- Li, G., S. Cao, N. Jiao y Z. Wen (2014) Classification of glass particles in parenteral product vials by visual, microscopic, and spectroscopic methods. *PDA J. Pharm. Sci. Tech.* 68(4):362-72.
- Li, L., J. Parasrampur, A. Bommireddi, E. Pec *et al.* (1998) Moist-heat sterilization and the chemical stability of heat-labile parenteral solutions. *Drug Develop. Industry Pharm.* 24(1):89-93.
- Madigan, M., J. Marting y J. Parker (2012) *Brock. Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall. pp. 440-560.
- Mahfoudh, A., F. Poncin-Épailard, M. Moisan y J. Barbeau (2010) Effect of dry-ozone exposure on different polymer surfaces and their resulting biocidal action on sporulated bacteria. *Surf. Sci.* 604:1487-1493.
- Mandal, J. y H. Brandl (2011) Bioaerosols in Indoor Environment - A Review with Special Reference to Residential and Occupational Locations. *Open Env. Biol. Monitor. J.* 4: 83-96.
- Melly, E., P. Genest, M. Gilmore, S. Little *et al.* (2002) Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J. Appl. Microb.* 92: 1105-1115.
- Mohr, A. (1997) Fate and transport of microorganisms in air. En: Hurst, C. *et al.* (Eds.), *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington. pp. 45-68.
- Murray, P., K. Rosenthal, M. Pfaller (2009) Flora microbiana comensal y patógena en el ser humano. En: *Microbiología Médica*. pp. 73-76.
- Pandey, R., A. TerBeek, N. Vischer, J. Smelt *et al.* (2013) Live cell imaging of germination and outgrowth of individual *Bacillus subtilis* spores. The effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. *PLoS ONE* 8(3).
- PNO-CC7-001 (2014) Análisis microbiológico del agua por el método de filtración por membrana. Edición 01.
- PNO-CC7-020 (2012) Determinación de la carga microbiana. Edición 01.
- Parenteral Drugs Association (2007) Moist Heat Sterilization in Autoclaves Cycle Development. Validation and routine operation. *PDA Tech. Rep. # 1*. pp. 12-17.
- Rahe, H. (2013) Sterilization of compounded parenteral preparations: verification of autoclaves. *Int. J. Pharm. Comp.* 17(2):94-8.
- Reineke, K., A. Mathys, D. Knorr (2011) The impact of high pressure and temperature on bacterial spores: inactivation mechanisms of *Bacillus subtilis* above 500 MPa. *J. Food Sci.* 76 (3) 189-197.
- Rutala, W. (1998) Selection and use of disinfectants in healthcare. En: Lippincott Williams and Wilkins (Eds.), *Hospital Epidemiology and Infection Control*. pp. 1161-1188.
- Sakudo, A. y H. Shintani (2011) *Sterilization and disinfection by plasma*. Nova Publisher, NY.
- Schnetzinger, F., P. Youwen y A. Nocker (2013) Use of propidium monoazide and increased amplicon length reduce false-positive signals in quantitative PCR for bioburden analysis. *App. Microb. Biotech.* 97(5): 2153-2162.
- Sutton, S. (2010) The Environmental Monitoring Program In a GMP Environment. *J. GXP Compl.* 14(3): 22-30.
- Underwood, E. (1992) Ecology of microorganisms as it affects in the pharmaceutical industry. En: Hugo, W.B. and Russell, A.D (Eds.), *Pharmaceutical microbiology*. 5th Ed. Blackwell Scientific Publication. London.
- United States Pharmacopeia-35. (2012) General Information <1211> Sterilization and Sterility Assurance of Compendial Articles. Ed. Rockville.
- United States Pharmacopeia-33 (2010) General Information. <1231> Water for pharmaceutical purposes. Ed. Rockville.
- United States Pharmacopeia-35. (2012) General Information <1116> Monitoring and microbiology control. Ed. Rockville.
- United States Pharmacopeia-33 (2010) Monogr.. *Pharmacop. Forum* 30(5): 14-16.
- Visweswaran, G., B. Dijkstra y J. Kok (2011): Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea—a comparative view. *Appl. Microbiol. Biotech.* 92:921-928.
- von Woedtke, T. y A. Kramer (2008) The limits of sterility assurance. *GMS Krankenhaus hygiene Interdisziplinär* 3(3): 1-10.
- Yoon, J., B. Yoon, H. Lee, Y. Kim *et al.* (2012) Comparison of sterilization of reusable endoscopy biopsy forceps by autoclaving and ethylene oxide gas. *Diagn. Dis. Sci.* 57: 405-12.
- Xu, Y., Y. He, L. Zhou, C. Gao *et al.* (2014) Effects of Contact Lens Solution Disinfectants against Filamentous Fungi. *Optom Vis Sci.* Oct 2.



Editor para correspondencia: Dra. Annia Hernández