ISBN 978-987-46701-4-4

Sección I.

Generalidades.

Página

Capítulo I.1. **Crecimiento Microbiano** 2
Mirta Franco

Capítulo I.2. **Fuentes de Contaminación microbiana de productos farmacéuticos y cosméticos** 16
María Cristina Fernández

Capítulo I.3. **Medios de cultivo** 23
Héctor Cerra

Capítulo I.4. **Cepario** 32
Mónica Alejandra Prieto

Capítulo I.5. **Los Hongos como contaminantes en la industria farmacéutica y cosmética** 46
Lilia Cavaglieri, Carina Pereyra, Verónica Alonso y Sofía Chulze

Capítulo I.1.

Crecimiento Microbiano

Mirta Franco

Introducción

Visualización del crecimiento

Medición del crecimiento

Estimación del número de microorganismos viables
- *Conteo en placa*
- *Número más probable*

Determinación de microorganismos totales
- *Conteo directo*
- *Medición de la masa celular*
- *Determinación de peso de la fracción celular*
- *Determinación de la Absorbancia*

Curva de crecimiento

Factores que modifican el crecimiento microbiano

Cultivo continuo

Cultivo sincronizado

Bibliografía

Introducción

El crecimiento microbiano puede definirse como el aumento de los constituyentes celulares. En los microorganismos que se multiplican por fisión binaria o gemación, el crecimiento produce un aumento del número de células. En los microorganismos cenocíticos, es decir aquellos que presentan muchos núcleos en un citoplasma común, como por ejemplo los hongos filamentosos no tabicados; el crecimiento produce aumento del tamaño, pero no del número de células. En bacterias, la síntesis regulada de todos los constituyentes de una célula bacteriana produce primero un aumento de su masa y luego, cuando ésta ha sido duplicada, la división de la bacteria por el mecanismo de fisión binaria. De esta manera se originan dos bacterias hijas de las que puede decirse que, en términos generales, son iguales entre sí e iguales a la bacteria parental que les dio origen. A continuación cada una de las bacterias hijas repetirá el ciclo de la bacteria parental y se originarán 4 bacterias, aumentando el número de ellas, es decir la población bacteriana, en progresión geométrica (Figura 1).

Visualización del crecimiento

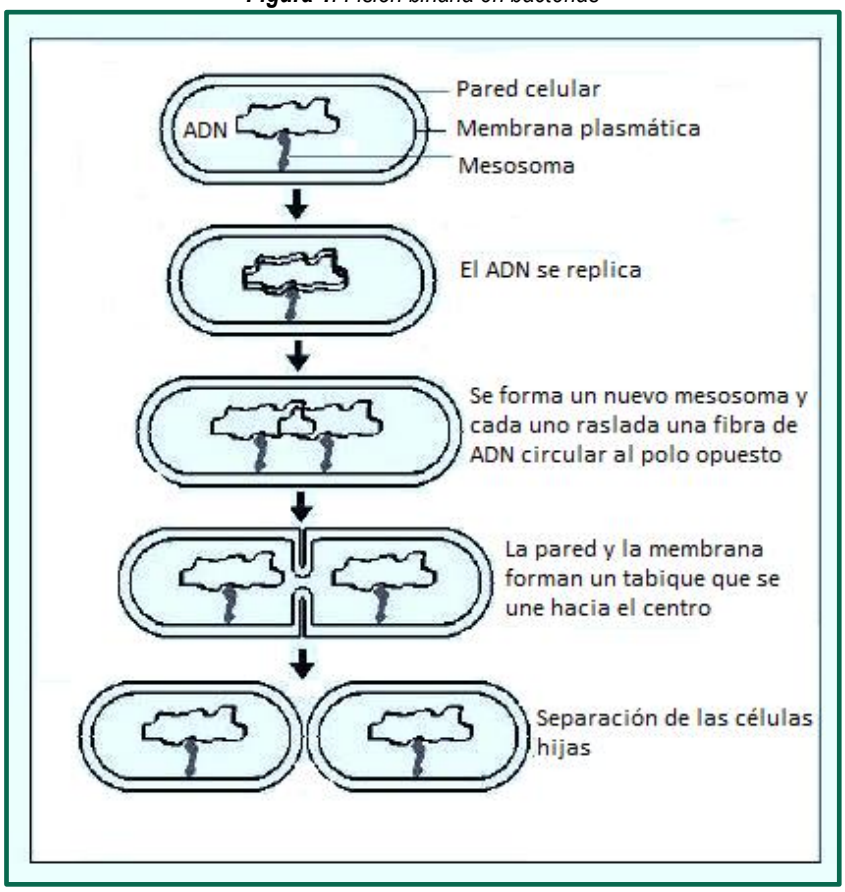
En medios líquidos el aumento del número de bacterias se visualiza como turbidez y/o formación de sedimento o película en los cultivos. En cambio, en medios agarizados el aumento del número de bacterias produce colonias macroscópicamente visibles, algunas de cuyas características (tamaño, forma, color, etc.) pueden contribuir a la identificación del microorganismo.

Medición del crecimiento

Para medir el crecimiento se pueden emplear técnicas que estimen el número de bacterias, ya sea totales o viables, o la masa celular. A continuación se describen algunos de los métodos más usados.

De acuerdo con la técnica empleada para el recuento, su resultado expresará el número de microorganismos totales (viables más no viables) o solamente viables presentes en una muestra, siendo éstos últimos los que poseen la capacidad de crecer y multiplicarse.

***Figura 1**: Fisión binaria en bacterias*



Estimación de microorganismos viables

Conteo en placa

El conteo de microorganismos viables en placa se basa en la formación de una colonia a partir de cada célula viable, utilizando como soporte medios agarizados en placas de Petri. No puede asegurarse indubitablemente que toda colonia derive de un solo microorganismo, por eso la forma correcta de expresar los resultados es como "unidades formadoras de colonias" (UFC).

El conteo se puede realizar por "*plaqueo*" en medios agarizados o por *retención en una membrana filtrante.* Las técnicas de conteo de viables en placas son sensibles, relativamente sencillas y se usan ampliamente para determinar el número de bacterias y otros microorganismos en muestras de alimentos, medicamentos, agua, etc.

La forma corriente de realizar un conteo de unidades formadoras de colonias es la siguiente: realizar diluciones seriadas 1/10 de una suspensión bacteriana o de una muestra en ensayo y sembrar volúmenes medidos de varias de ellas en placas con medios agarizados, de modo que todas las colonias desarrolladas estén separadas. Esto se logra cuando el número de colonias por placa de Petri es entre 30 y 300, dependiendo del tamaño de las colonias originadas. En general, por encima de ese límite hay superposición de colonias y por debajo de él la significación estadística es muy pobre.

Las siembras se pueden hacer:

a) por diseminación: esparciendo con una espátula triangular un volumen de 0,1 – 0,2 ml de la dilución adecuada sobre la superficie del medio ya gelificado y secado, contenido en la placa, o

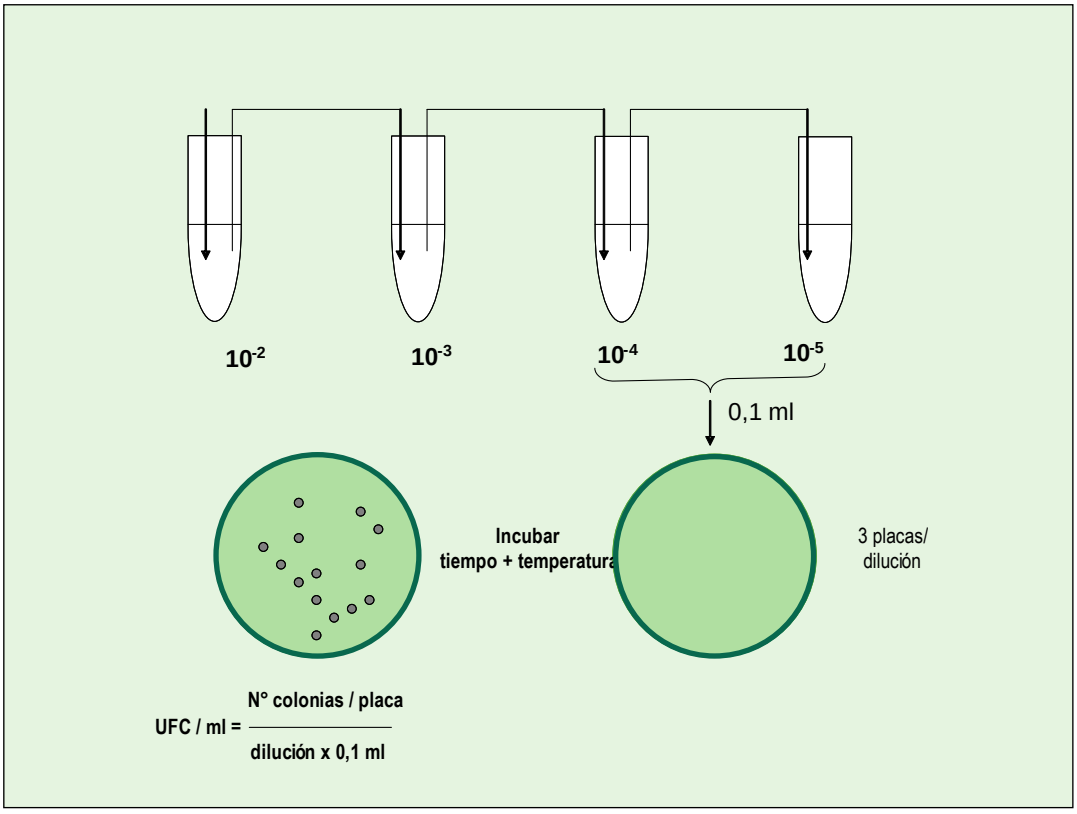
b) en profundidad: incorporando la muestra o una dilución de ella en un volumen de medio fundido, mantenido a temperaturas compatibles con la viabilidad microbiana (aproximadamente 45° C), que luego se vuelca en una placa de Petri y se deja gelificar. El volumen de muestra puede ser de hasta el 10% del volumen del medio.

En ambos casos el número de placas sembradas con cada dilución dependerá de la precisión deseada, pero es aconsejable 3 como mínimo.

Luego de la incubación en las condiciones apropiadas para cada microorganismo, la concentración de UFCs presentes en una suspensión se calcula multiplicando el número de colonias por placa, promedio de varias placas, por la inversa de la dilución de la suspensión, y dividiendo por el volumen sembrado:

$$UFC\ /\ ml = \frac{N^{o}\ de\ colonias\ por\ placa}{Volumen\ sembrado\ \ x\ \ dilución}$$

Figura 2: *Recuento en placa por diseminación en superficie*



En la Figura 2 se esquematiza el procedimiento para contar las UFC/ml en una suspensión bacteriana, utilizando la técnica de siembra por diseminación en superficie. Si, por ejemplo, un volumen de 0,1 ml de la dilución 1 x 10^{-4} de un cultivo origina un promedio de 120 colonias por placa, el número de UFC por mililitro de cultivo será de 1,2 x 10^{7} (120 UFC / 10^{-4} x 0,1 ml).

Cuando el número de microorganismos viables presentes en una muestra es bajo, en el caso de muestras que lo permitan, se puede recurrir a la filtración de la misma a través de filtros de membrana que retienen bacterias. Luego de filtrar la suspensión que contiene las bacterias a cuantificar, la membrana se coloca sobre la superficie de un medio agarizado o sobre una fina almohadilla de papel absorbente (*pad*) embebido con medio líquido, se incuba en condiciones adecuadas y se cuentan las colonias, que representan el número de UFC presentes en el volumen de muestra filtrado.

Tanto para la técnica de "plaqueo" directo como para la de filtración se pueden utilizar medios especiales, selectivos y/o diferenciales, que permiten el conteo de bacterias específicas.

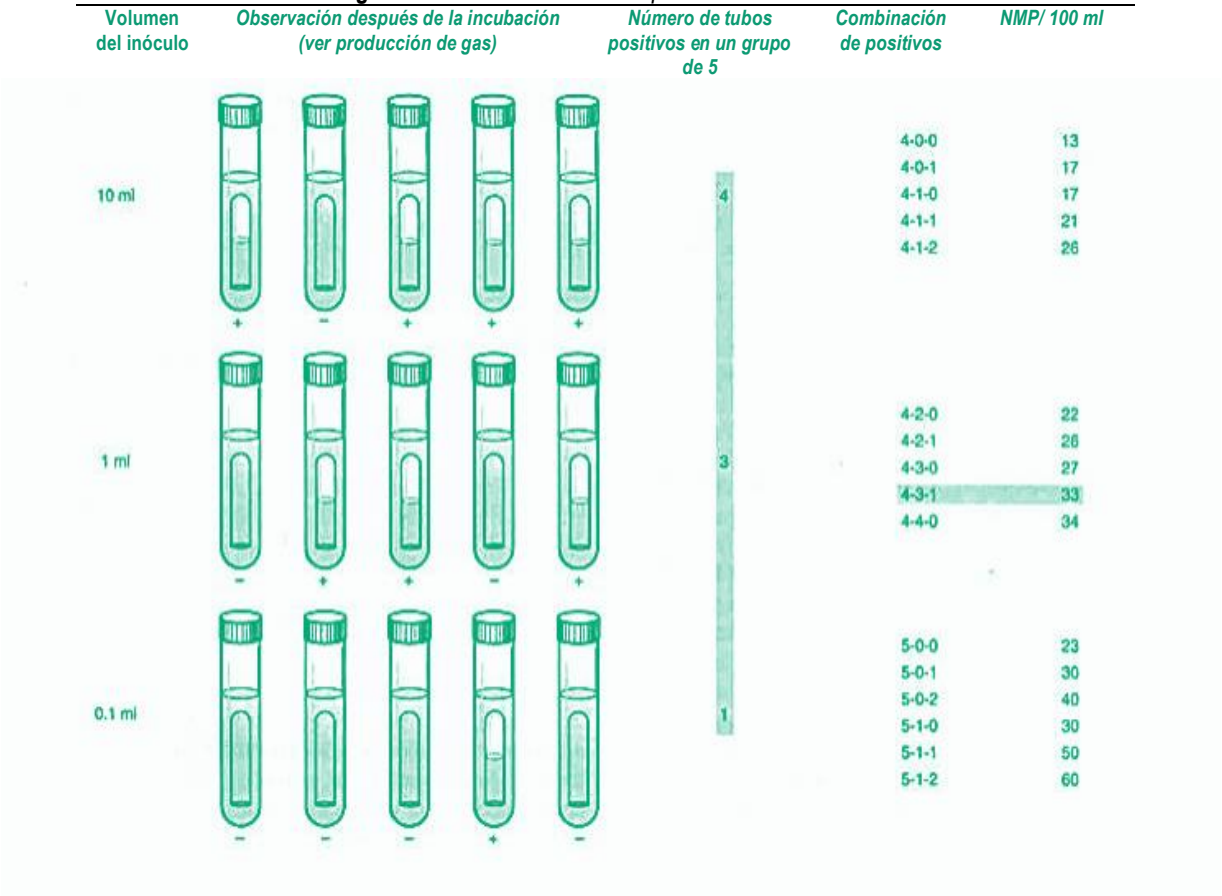
Número más probable

La concentración de microorganismos viables puede ser estimada por el método del número más probable (NMP). Este método infiere matemáticamente el número de viables a partir de la fracción de cultivos en tubos que no muestran crecimiento.

Consiste en realizar varias diluciones de la muestra, inocular varias réplicas de las mismas en tubos conteniendo un medio de cultivo líquido apropiado y registrar el número de tubos con crecimiento correspondiente a cada ~~en~~ cada dilución.

Es un método estadísticamente ineficiente, por lo que es necesario sembrar varios tubos con cada dilución. Sin embargo, resulta útil para estimar el número de microorganismos viables en suspensiones con baja concentración o que producen algún metabolito detectable en el medio, que permita diferenciarlo de otros microorganismos presentes en la muestra, por ejemplo para la determinación cuantitativa de coliformes en aguas. En la Figura 3 se muestra un ejemplo utilizando una tabla con tres niveles de diluciones y 5 tubos por dilución y la producción de gas como criterio de positividad.

Figura 3. *Estimación de viables por el método del NMP*



Determinación de microorganismos totales

Se emplean métodos que determinan directamente el número de bacterias suspendidas en un medio líquido o el peso correspondiente a la fracción celular. También se pueden utilizar métodos indirectos, entre ellos el más utilizado es la determinación de la absorbancia de las suspensiones celulares que, dentro de cierto margen y en condiciones estandarizadas, es proporcional a la masa celular.

Conteo directo

El conteo en cámara por microscopía óptica es un método útil para determinar el número de bacterias totales en una suspensión, cuando su concentración no es demasiado baja. Brinda también información sobre el tamaño y la morfología de los microorganismos, pero no permite diferenciar los microorganismos viables de los no viables.

Las suspensiones se colocan en cámaras de conteo de volumen conocido. En el caso del recuento de bacterias estas cámaras poseen un espesor sensiblemente menor que los hemocitómetros, debido al menor tamaño de las bacterias. Las cámaras de Petroff-Hausser tienen un espesor de 0,02 mm, que las hace particularmente aptas para el conteo de bacterias. La superficie de la cámara es de 1 mm^2 y está dividida en 25 cuadrados. Luego, el número de bacterias por mm^3 se calcula multiplicando el número de bacterias en un cuadrado por el número de cuadrados (25) y por la inversa del espesor (1 / 0.02 = 50). Esta técnica requiere un alto nivel de control de calidad operativa y aun así tiene un amplio margen de variación.

Los protozoos, algas y levaduras, que son de mayor tamaño que las bacterias, pueden contarse con contadores electrónicos (Coulter). Este método consiste en hacer pasar una suspensión de microorganismos a través de un pequeño orificio. A través éste fluye una corriente eléctrica y los electrodos situados a ambos lados miden su resistencia eléctrica. Cada vez que una célula microbiana atraviesa el orificio, aumenta la resistencia eléctrica y se cuenta la célula.

Medición de la masa celular

El aumento del número de microorganismos va acompañado de un aumento continuo de la masa celular en el cultivo que, por supuesto, refleja el total de las células (viables más no viables). La masa celular en un cultivo microbiano puede medirse directamente determinando el *peso de la fracción celular* o indirectamente midiendo la absorbancia de las suspensiones microbianas.

Determinación del peso de la fracción celular

Se puede determinar el peso seco o húmedo de la fracción celular en una alícuota de una suspensión. Como el contenido de humedad de la fracción húmeda puede ser variable, resulta más reproducible la determinación del peso seco. Para ello las alícuotas a analizar se colocan en pesafiltros previamente tarados, se evapora a sequedad en estufas y se determina su nuevo peso. La diferencia con la tara corresponde al peso celular en la alícuota. En ciertos casos es necesario lavar la fracción celular presente en las alícuotas por sucesivas centrifugaciones y resuspensiones en soluciones acuosas adecuadas. La determinación del peso de la fracción celular técnica tiene la desventaja de ser poco sensible, se requiere grandes cantidades de microorganismos y suficiente cantidad de muestras para cumplir exigencias estadísticas de reproductibilidad, por lo que es una técnica larga y engorrosa. Se la usa principalmente para medir la masa de cultivos de hongos filamentosos.

Manteniendo el mismo principio de la obtención de células por centrifugación de un volumen determinado de una suspensión bacteriana, se puede estimar la masa celular midiendo, en el sedimento final, el contenido de diferentes elementos (nitrógeno, carbono) y/o moléculas (ácidos nucleicos, proteínas, etc.)

Determinación de la absorbancia

Una técnica más rápida, más sensible y de uso corriente para estimar la concentración de bacterias totales en una suspensión se basa en medir espectrofotométricamente la *dispersión de la luz* producida por las bacterias presentes en dicha suspensión. A medida que aumenta la concentración de bacterias el cultivo se vuelve más turbio (aumenta la absorbancia) y la luz transmitida es menor. Debido a que las células de una especie bacteriana tienen tamaños relativamente constantes, la dispersión de la luz puede considerarse proporcional a la concentración de bacterias en la suspensión. La relación lineal entre absorbancia y concentración celular sólo se cumple en un rango determinado de concentraciones y, además, la absorbancia de una suspensión bacteriana no depende sólo de la masa celular sino también de otros factores, como por ejemplo la forma de las bacterias. Por ello es aconsejable realizar una curva de calibración para cada sistema, de modo de establecer la relación entre la absorbancia o densidad óptica (DO) y el parámetro estimado, efectuando distintas diluciones de una suspensión concentrada y midiendo sus respectivas absorbancias.

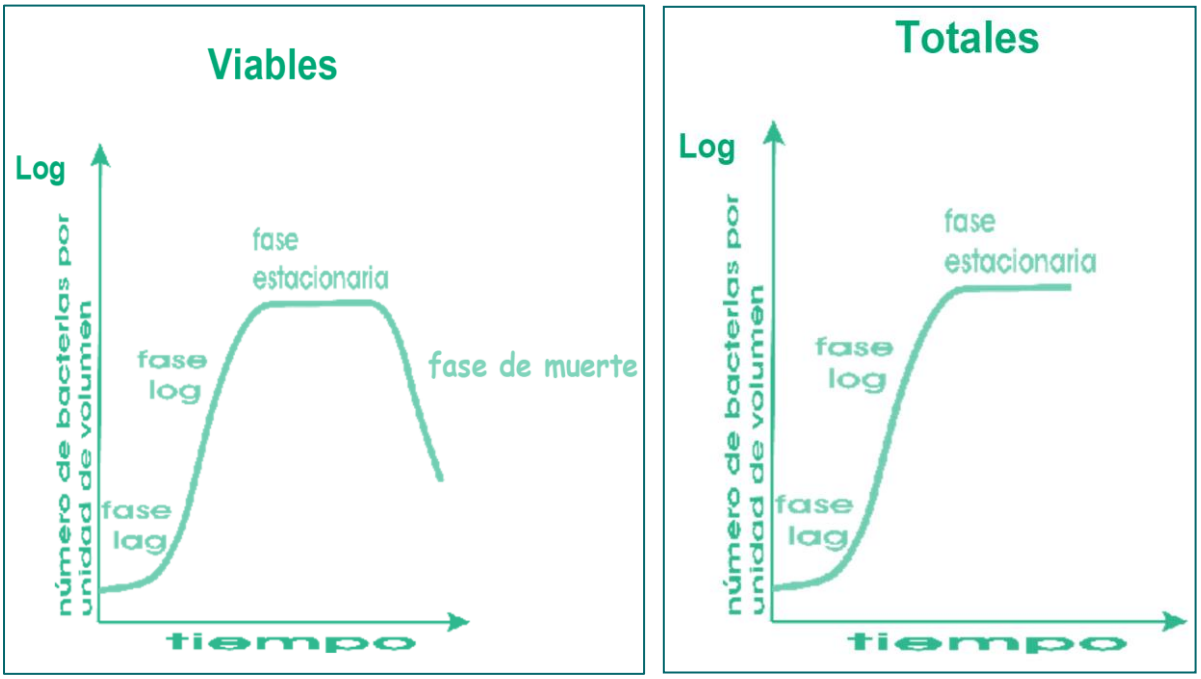
Esta técnica es de gran aplicación en los ensayos microbiológicos de factores de crecimiento y antibióticos en medios líquidos. También se aplica esta técnica para estandarizar suspensiones inóculo, aunque en la práctica diaria de laboratorio se utilizan comparadores de turbidez (escala de *Mc Farland*) con los cuales se efectúan cálculos de concentración de bacterias.

Curva de crecimiento

De acuerdo con lo dicho anteriormente, cuando una célula bacteriana se encuentra en un medio ambiente en el que puede sintetizar en forma regulada todos sus constituyentes, se observa primero un crecimiento individual, es decir un aumento de su masa y de su volumen, y luego un crecimiento de la población debido a sucesivas divisiones celulares. La masa aumenta continuamente, mientras que el número de bacterias se duplica a intervalos de tiempo regulares.

Cuando un número N_0 de bacterias, cuyos ciclos celulares no están sincronizados, se inoculan en un medio de cultivo líquido que les provee todos los nutrientes necesarios y se incuba en condiciones adecuadas a sus requerimientos, se produce el aumento de la población bacteriana. En la Figura 4 se muestran gráficos del logaritmo del número de bacterias viables y totales presentes en un cultivo cerrado versus el tiempo de incubación. En las curvas de crecimiento se observan las siguientes fases: adaptación, crecimiento exponencial, estacionaria máxima y muerte (sólo en la curva de viables).

Figura 4. *Curvas de crecimiento de bacterias viables y de bacterias totales*



Fase de adaptación o fase lag o fase de retardo

Durante esta etapa el metabolismo de las bacterias inoculadas se adapta a las nuevas condiciones de cultivo. Si bien las bacterias son activas metabólicamente, no se observa aumento del número. Su duración es variable, pudiendo ser muy corta o estar ausente cuando las bacterias están capacitadas para utilizar inmediatamente los nutrientes (por ejemplo cuando provienen de un cultivo en fase exponencial en el mismo medio de cultivo) o ser relativamente larga cuando las bacterias: a) están injuriadas, b) son viejas y, por lo tanto, deficientes en ATP, cofactores esenciales y ribosomas, y c) la composición del medio es diferente a la de aquel del que provienen y se hace necesaria la inducción de algunas enzimas para poder utilizar algún nutriente esencial.

También influyen sobre su duración algunos factores físicos que modifican la velocidad de reacciones enzimáticas, como la temperatura, el pH y la fase gaseosa.

Fase de crecimiento exponencial o logarítmico

Durante esta etapa cada bacteria es capaz de duplicar su masa y dividirse a intervalos regulares, dando lugar al crecimiento exponencial de la población. Aunque la división celular ocurre a intervalos regulares, la falta de sincronización entre los ciclos individuales de cada célula hace que tanto el aumento de la masa como el del número de bacterias se observen como una función continua. La fase de crecimiento exponencial representa la

etapa en la que la velocidad de crecimiento es constante y máxima para esas condiciones de cultivo. La velocidad de crecimiento puede ser modificada cambiando la composición del medio de cultivo y/o las condiciones de incubación.

El período de tiempo entre dos divisiones sucesivas se denomina tiempo de generación (g) y es una estimación de la velocidad de crecimiento. Cuando g = 30 minutos, la población se duplica cada 30 minutos, es decir 2 veces por hora. Cuando g es menor, por ejemplo 20 minutos, se producen 3 divisiones por hora, es decir la velocidad de crecimiento es mayor. Luego, la relación entre g y velocidad de crecimiento es inversa, a mayor g menor velocidad de crecimiento y viceversa.

La expresión matemática del crecimiento exponencial es:

$$N_t = N_0 \times 2$$

donde: N_t = *número de bacterias al tiempo t*
N_0 = *número inicial de bacterias (tiempo 0)*
n = número de generaciones

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

La velocidad de crecimiento se puede expresar también como la constante de velocidad de crecimiento (k), que representa el número de generaciones por unidad de tiempo.

$$k = n / t$$

cuando n = 1 y t = g; luego k = 1 / g

Fase estacionaria máxima

El crecimiento bacteriano en un cultivo cerrado, en el que no hay aporte de nuevos nutrientes ni remoción de los productos del metabolismo, es autolimitado. Luego de varias generaciones, diversos factores, entre ellos la disminución o agotamiento de los nutrientes disponibles, la acumulación de productos metabólicos tóxicos y la disminución del espacio vital, hacen que la multiplicación bacteriana cese o que su velocidad de crecimiento disminuya a niveles que se equilibran con la velocidad de muerte.

La concentración de células en esta fase se denomina cosecha máxima, y depende del tipo de microorganismo, de la composición del medio y de las condiciones de incubación.

Fase de muerte

Desde un punto de vista biológico la muerte celular representa la pérdida de su capacidad de multiplicación, aunque no significa necesariamente pérdida absoluta e inmediata de todas las funciones celulares. El único criterio válido de muerte bacteriana es la pérdida irreversible de la capacidad de reproducirse en cualquier medio adecuado para ello. Queda así definido un concepto fundamental, la *viabilidad*, que permite diferenciar en una población dos clases de bacterias:

a) las bacterias viables (o vivas) que son aquéllas que conservan su capacidad reproductora, y
b) las bacterias no viables (o muertas) que son las que han perdido esa capacidad.

Por lo tanto, la observación de la fase de muerte sólo es posible cuando se analiza la evolución del número de bacterias viables presentes en la población.

La muerte bacteriana responde a una cinética exponencial, es decir que en períodos de tiempo iguales se mueren porcentajes constantes de la población.

En algunos casos la muerte bacteriana va acompañada de lisis celular, observándose no sólo disminución del número de bacterias viables sino también de la masa celular. En estos casos se observa una fase de declinación en los gráficos de curvas de crecimiento de bacterias totales.

La muerte de las bacterias puede provocarse por el uso de agentes antimicrobianos con actividad bactericida. Este tema se desarrolla en la Sección II del presente manual.

Factores que modifican el crecimiento bacteriano

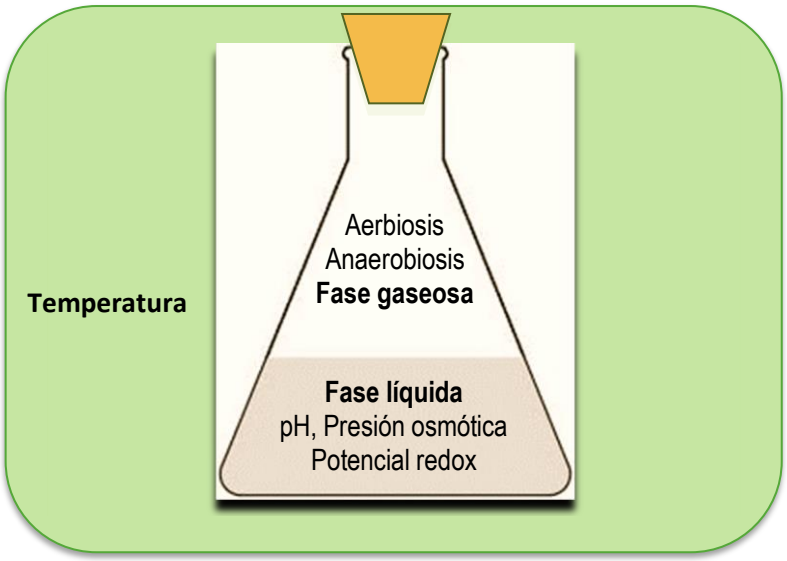
De acuerdo a lo que hemos visto, la multiplicación bacteriana requiere el aporte de sustancias químicas (nutrientes) y condiciones físicas y químicas adecuadas. El conocimiento de los factores que modifican el crecimiento bacteriano nos permitirá:

1) establecer condiciones de laboratorio en las cuales una o más especies bacterianas puedan desarrollar satisfactoriamente, de modo de poder evidenciar y cuantificar su presencia en cualquier muestra.
2) controlar la proliferación bacteriana impidiendo o desfavoreciendo su multiplicación.

Del mismo modo las propiedades físicas y químicas de productos tales como alimentos, medicamentos, etc., orientan sobre la calidad de los microorganismos eventualmente presentes.

Veremos a continuación cuáles son los principales factores que inciden sobre el crecimiento bacteriano.

Figura 5. *Elementos fundamentales de un cultivo en medio líquido*



Nutrientes y factores de crecimiento

Entre los principales factores que influyen sobre la velocidad de crecimiento debe considerarse la calidad y cantidad de los nutrientes disueltos en el medio de cultivo.

Cualitativamente estos nutrientes deben proveer todos los elementos químicos que necesitan las bacterias (carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, azufre, iones inorgánicos, etc.) para biosintetizar sus componentes, y la energía necesaria para llevar a cabo sus funciones. De acuerdo a las capacidades metabólicas de las bacterias, diferentes formas químicas de un mismo elemento pueden determinar velocidades de crecimiento diferentes.

Por otra parte, la concentración de cada uno de esos compuestos químicos influye sobre la velocidad de crecimiento. En general puede definirse una concentración óptima para cada nutriente, que es aquélla que produce la mayor velocidad de crecimiento en determinadas condiciones. Concentraciones inferiores a la óptima se denominan concentraciones limitantes. En el rango de las concentraciones limitantes, un aumento de la concentración del nutriente se traduce en un aumento de la velocidad de crecimiento. Por encima de la concentración óptima pueden darse dos efectos; que el aumento de la concentración del nutriente no modifique la velocidad de crecimiento, o que la disminuya por efectos tóxicos derivados de altas concentraciones del mismo. Al igual que lo que ocurre con la velocidad de crecimiento, cuando el crecimiento bacteriano es limitado por la baja

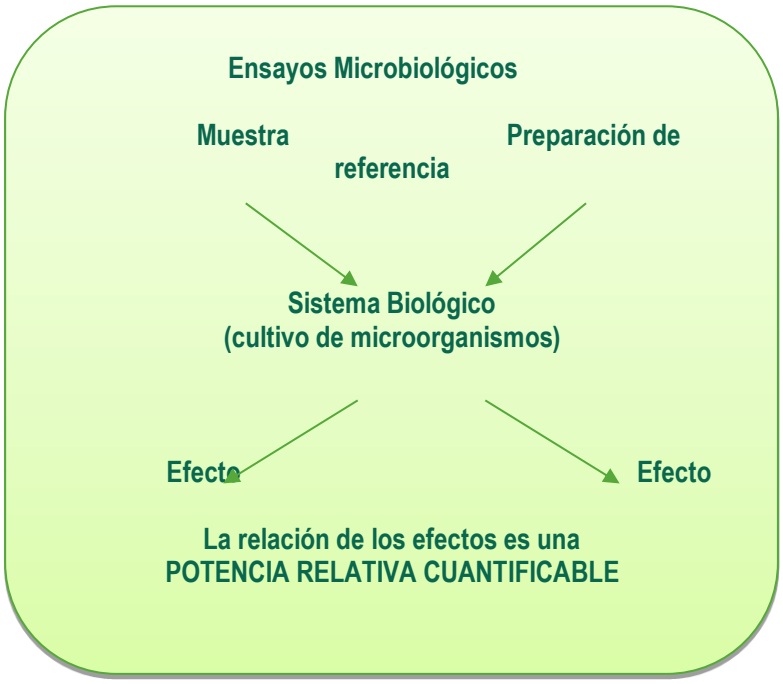
concentración de un nutriente requerido, el crecimiento neto final o cosecha máxima también aumenta con la cantidad inicial del nutriente limitante.

Además de los nutrientes, muchas bacterias requieren *factores orgánicos de crecimiento*, es decir sustancias que no pueden sintetizar a partir de los nutrientes generales y que cubren requerimientos específicos. Ejemplos de factores de crecimiento son los aminoácidos, las vitaminas y los derivados de purinas y pirimidinas. En estos casos no existe la posibilidad de que un compuesto pueda ser reemplazado por otro, salvo que se trate de un precursor de éste. No obstante, el efecto de la variación de la concentración del factor de crecimiento sobre la velocidad de crecimiento y la cosecha máxima es análogo al descripto para los nutrientes, aunque con una diferencia sustancial en lo que se refiere a los rangos de concentraciones, que en el caso de los primeros es del orden de nano o picogramos, muy inferior al de los de los nutrientes. Este es el fundamento de los ensayos microbiológicos de vitaminas y otros factores de crecimiento.

Ensayos microbiológicos de factores de crecimiento:

En el punto anterior nos referimos a un aumento de la velocidad de crecimiento debido a un aumento de la concentración de un factor de crecimiento, en el rango de concentraciones limitantes. Esta observación permitió diseñar ensayos sensibles y específicos que permiten cuantificar sustancias hidrosolubles que actúan como factores de crecimiento de diferentes bacterias. Estos ensayos se basan en determinar, a un tiempo dado, el crecimiento de una bacteria de ensayo frente a distintas concentraciones de una preparación de referencia de la sustancia a ensayar y comparar este crecimiento con el que produce una preparación de la misma sustancia cuya actividad se quiere conocer (Figura 6). Debido a su sensibilidad y especificidad, los bioensayos permiten determinar sustancias activas que se encuentran en concentraciones muy bajas, aún en mezclas complejas. Estas propiedades los hacen particularmente útiles no sólo para el control de calidad de productos que contienen una sustancia activa sino también para estudios clínicos y de biodisponibilidad.

Figura 6. *Fundamento de los ensayos microbiológicos*



Por ejemplo, si deseamos determinar la concentración de vitamina B_{12} en una solución polivitamínica, debemos disponer de una suspensión de bacterias auxótrofas para vitamina B_{12}, (es decir que no la sinteticen, pero la requieran), de un medio de cultivo basal (que no contenga vitamina B_{12}) y de un patrón de vitamina B_{12} de concentración conocida (preparación de referencia). Se prepara una serie de medios de cultivos que contienen diferentes concentraciones de vitamina B_{12}, agregando diferentes diluciones de la preparación de referencia al medio de cultivo basal. Se siembran esos medios, previamente esterilizados, con la suspensión de la bacteria

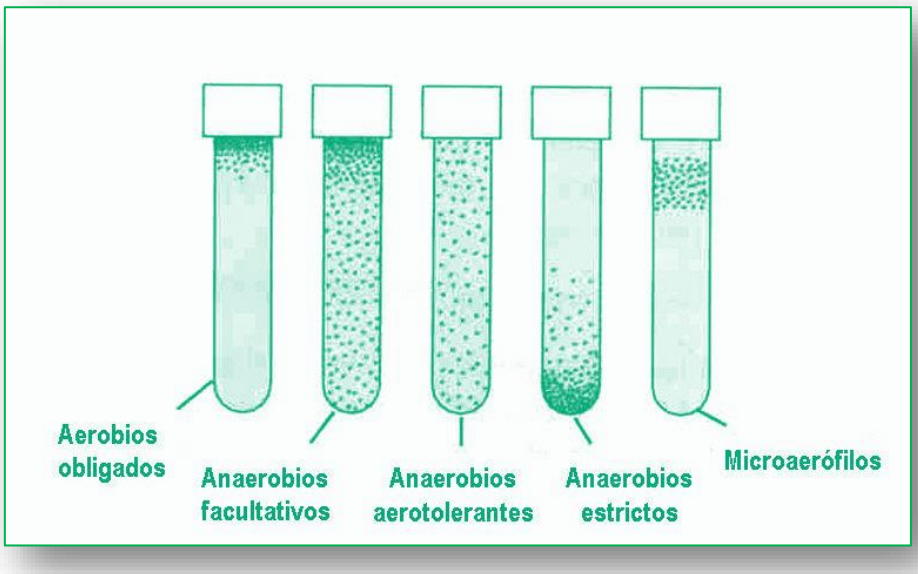
auxótrofa. A un tiempo dado, se detiene el crecimiento, se mide la absorbancia de los cultivos y se construye una curva de absorbancia versus la concentración de vitamina B_{12} originalmente presente en los medios. Paralelamente se realiza el mismo procedimiento reemplazando la preparación de referencia por la muestra a analizar. De esta manera se obtienen dos curvas que, si satisfacen los requisitos de regresión, linealidad y similitud, permiten calcular la concentración de vitamina B_{12} en la muestra. Para más detalles ver el capítulo "Valoración microbiológica de antibióticos y Factores de Crecimiento" en el presente manual.

La composición de los medios de cultivo determina además otras propiedades de ellos, como ser pH, presión osmótica, actividad de agua, potencial de óxido-reducción, etc., a los que debe sumarse la influencia del ambiente externo, que incluye la atmósfera gaseosa y la temperatura de incubación.

Concentración de oxígeno molecular

De acuerdo a su requerimiento de oxígeno molecular, las bacterias se clasifican en aerobias y anaerobias. Las bacterias aerobias requieren O_2 para crecer; las anaerobias facultativas no requieren O_2, pero cuando está presente lo utilizan; las anaerobias aerotolerantes no requieren ni utilizan O_2, y las anaerobias estrictas no sólo no requieren O_2, sino que les resulta altamente tóxico, induciendo alteraciones metabólicas y la muerte bacteriana. Ver Figura 7.

Figura 7. *Clasificación de los microorganismos por su requerimiento y tolerancia al O_2.*



El crecimiento de las bacterias aerobias y de las anaerobias facultativas en presencia de O_2 depende de la concentración de oxígeno en solución. Dado que el oxígeno es relativamente insoluble (<10 mg/l), su concentración en los cultivos disminuye rápidamente. En medio sólidos, las bacterias aerobias pueden crecer fácilmente sobre la superficie del medio. En los cultivos líquidos estáticos, el crecimiento aeróbico generalmente ocurre cerca de la superficie en contacto con el aire, pues lejos de ella las condiciones se hacen anaerobias y se impide el crecimiento. Para incrementar el crecimiento es necesario aumentar la superficie de contacto entre las fases líquida y el aire, siendo la forma más utilizada para lograrlo la agitación mecánica. También puede burbujearse aire estéril.

El cultivo de bacterias anaeróbicas y en especial de las anaerobias estrictas es realmente un complejo problema técnico en el que aun disponiendo de equipos modernos se requiere un alto nivel de especialización. Puede realizarse en medios sólidos o en medios líquidos, evitando la exposición al O_2. En medios sólidos, pueden cultivarse ya sea sobre la superficie de placas con agar nutritivo, incubadas en una atmósfera libre de oxígeno, o bien dentro de un medio agarizado desoxigenado y solidificado. Para la incubación anaeróbica de los cultivos en placa se usan vasijas de distintos tipos, en los cuales se puede evacuar el aire y llenarlas con nitrógeno puro, con hidrógeno o con una mezcla de cualquiera de estos dos gases y CO_2. A veces el aire es reemplazado por hidrógeno

y las últimas trazas de oxígeno son eliminadas por combustión, lo que se efectúa con ayuda de un catalizador que va incorporado a la vasija.

En medios líquidos, las bacterias anaerobias pueden ser protegidas de los efectos tóxicos del oxígeno mediante la incorporación al medio de un fuerte agente reductor. La inclusión de ascorbato, tioglicolato sódico, cisteína o trazas de sulfito sódico en el medio de cultivo, permite manejar anaerobios que no requieren condiciones rigurosas de exclusión del O_2. El medio puede liberarse del oxígeno disuelto por ebullición y luego protegerse cubriendo su superficie con una capa de aceite mineral. A tales medios se les suele incorporar una pequeña cantidad de agar para aumentar su viscosidad y disminuir la disolución del O_2 del aire y un indicador de oxido-reducción (por ejemplo medio con tioglicolato utilizado para los ensayos de esterilidad).

La manera más útil para medir el grado de anaerobiosis de un medio de cultivo es el potencial de oxidación-reducción o potencial redox (Eh). En medios corrientes, la mayoría de las bacterias anaerobias son inhibidas a valores de Eh mayores que –100 mV, y algunas no inician su crecimiento con potenciales superiores a –330 mV.

Actividad de agua y presión osmótica

Los microorganismos necesitan disponer de agua en el medio para poder crecer. La cantidad de agua disponible en un medio o *actividad de agua* (a_w) depende del efecto osmótico, es decir de su interacción con las moléculas de solutos, y de la posibilidad de adsorción sobre superficies de sólidos. La actividad de agua de un medio es igual a la relación entre la presión de vaporπPuede calcularse a partir de la humedad relativa en una cámara sellada en la que se ha alcanzado el equilibrio entre el medio de cultivo y el aire (por ejemplo, si la humedad es del 95%, la actividad de agua del medio es 0,95).

La actividad de agua está inversamente relacionada a la presión osmótica (π): a mayor presión osmótica, menor a_w.

$$\pi = -\frac{RT}{\bar{V}} \ln a_w$$

donde *R es la constante gaseosa,*
T es la temperatura absoluta
V es el volumen de 1 mol de agua

La mayoría de las bacterias tienen valores óptimos de a_w superiores a 0.98. Las variaciones en la a_w pueden afectar la velocidad de crecimiento, la composición celular y las actividades metabólicas de las bacterias; por ello la desecación o el agregado de grandes cantidades de sales o azúcares son métodos muy efectivos para preservar los alimentos de la contaminación microbiana. Es bien conocido que los jarabes y las jaleas son poco susceptibles a la contaminación bacteriana.

Los microorganismos denominados *osmotolerantes* que pueden retener agua y mantener una alta concentración interna de solutos, son capaces de crecer en un amplio rango de actividad de agua o presión osmótica. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* puede cultivarse en medios que contienen concentraciones de cloruro de sodio de hasta 3 moles por litro; y algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae,* en soluciones de azúcares de a_w = 0.6. Algunas bacterias halófilas crecen mejor en altas concentraciones de cloruro de sodio y $a_w \cong 0.80$.

pH

Algunas bacterias pueden crecer a pH 1.0 y otras a pH 11.0, pero el rango de pH apto para el crecimiento de cada una es generalmente estrecho. Cada especie crece en un rango definido de pH y posee un pH óptimo de crecimiento: las *acidófilas* entre 0 y 5.5, las *neutrófilas* entre 5.5 y 8.0 y las *alcalófilas* entre 8.5 y 11.5. En general, una disminución del pH produce una disminución de la velocidad de crecimiento. Este fenómeno es utilizado desde hace muchísimo tiempo para aumentar la vida útil de alimentos lácteos (leches acidificadas, yogur, etc.).

Los cambios de pH del medio pueden modificar la ionización de los nutrientes y reducir su asimilación por los microorganismos. A pesar de las amplias variaciones de pH del medio, el pH interno de la mayoría de las bacterias se mantiene próximo a la neutralidad. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicarlo: impermeabilidad de la membrana a protones, intercambio de iones sodio o potasio por protones, etc. Sin embargo, variaciones

drásticas de pH pueden inhibir la actividad de enzimas y proteínas transportadoras de membrana, y si el pH interno de las células disminuye mucho, las bacterias mueren.

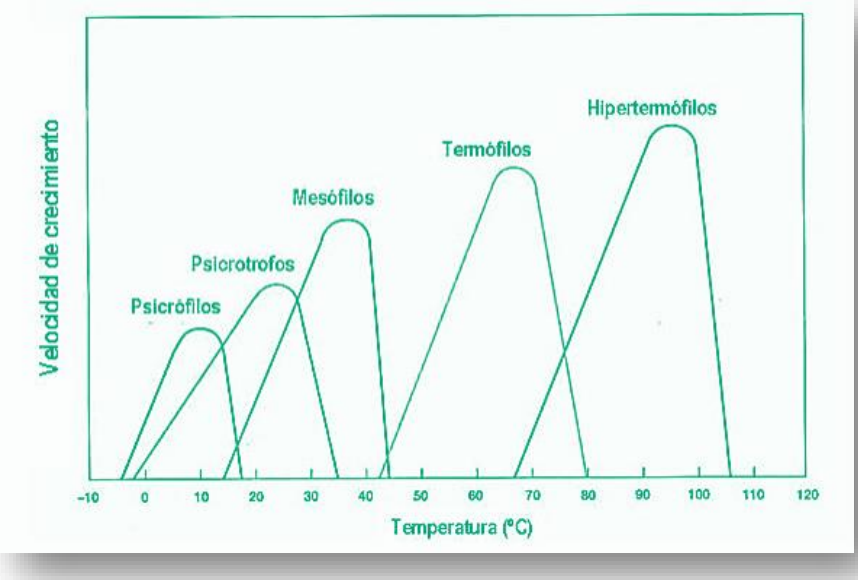
Muy frecuentemente, los microorganismos provocan el cambo del pH de su propio hábitat pues producen y liberan metabolitos ácidos o básicos. Por ejemplo, es bien conocido que la fermentación de hidratos de carbono produce ácidos orgánicos y que la degradación de aminoácidos genera amonio. El pH de los cultivos se controla usualmente incorporando al medio soluciones *buffers* (por ejemplo, mezclas de fosfatos monoácido y diácido), aunque su potencial regulador es limitado. Para un control más eficiente se debe recurrir a la adición automática de ácidos o bases.

Algunos medios de cultivo tienen incorporados indicadores de pH, cuyo viraje indica determinada actividad metabólica. Se usan para identificar microorganismos

Temperatura

Además de la composición de los medios de cultivo un factor muy importante que afecta la velocidad de crecimiento es la temperatura de incubación. Del mismo modo que para los nutrientes, puede definirse una temperatura óptima como la que posibilita la mayor velocidad de crecimiento. Por debajo de la temperatura óptima puede definirse un rango más o menos extendido de temperaturas en las que las bacterias crecen, aunque con velocidades cada vez menores a medida que nos alejamos de la temperatura óptima. Éste es el fundamento del alargamiento de la vida útil de un producto conservado a temperaturas de refrigeración. Por encima de la temperatura óptima la velocidad de crecimiento también disminuye, pero el rango de temperaturas compatibles con el crecimiento es muy estrecho, pues el aumento de la temperatura produce desnaturalización de las proteínas. Por esta razón, la temperatura máxima está mucho más cerca de la óptima de lo que lo está la temperatura mínima (Figura 8). Si bien en su conjunto los microorganismos son capaces de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas, no todas las especies tienen la misma temperatura óptima ni el mismo rango de temperaturas compatibles con el crecimiento. Existen especies capaces de desarrollar a temperaturas superiores a 40 °C (*termófilas)*, otras que lo hacen entre 20 °C y 40 °C (*mesófilas*) y otras a temperaturas inferiores a 20 °C, incluso a temperaturas de refrigeración (*psicrófilas*) (Figura 8).

Figura 8. *Clasificación de los microorganismos de acuerdo a sus temperaturas cardinales*



Las bacterias termófilas tienen algunas aplicaciones interesantes. Por ejemplo, las endosporas de *Geobacillus stearothermophilus* se utilizan como indicadores biológicos de los procesos de esterilización por vapor saturado a

presión superior a la normal. *Thermus aquaticus* y *Thermococcus litoralis* producen las polimerasas Taq y Vent, respectivamente, ambas de uso muy extendido en la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

Es evidente que el calor ejerce una acción deletérea en la mayoría de los microorganismos. Temperaturas elevadas son el agente esterilizante de elección cuando los materiales son resistentes a ellas, como se verá en el capítulo "Esterilización" del presente manual. Por otra parte, el frío se usa para la conservación de microorganismos viables.

Otros factores físicos que pueden afectar el crecimiento son la *presión hidrostática* y las *radiaciones*, principalmente ionizantes y ultravioleta. En cuanto a la presión, sólo es importante en bacterias capaces de crecer en las profundidades de océanos. Las radiaciones ionizantes son dañinas para las bacterias, ya que en bajos niveles producen mutaciones, que pueden ser letales, pero en altas dosis son directamente letales; a tal punto que se utilizan como agentes esterilizantes.

Las consideraciones anteriores también permiten comprender por qué los tejidos del organismo humano resultan particularmente aptos para la sobrevivencia y multiplicación de muchas especies microbianas, principalmente las quimioheterótrofas mesófilas con rango de pH óptimo cercano a la neutralidad. Como es sabido, en la mayoría de las enfermedades de origen microbiano se requiere una concentración umbral de una especie microbiana para producir una enfermedad, concentración que dependerá de su mecanismo de patogenia, de su virulencia y de las condiciones inmunológicas del huésped. Estas consideraciones justifican, de alguna manera, los requisitos de esterilidad, biocarga máxima y ausencia de determinadas especies en productos no estériles.

Figura 9. *Esquema de quimiostato*

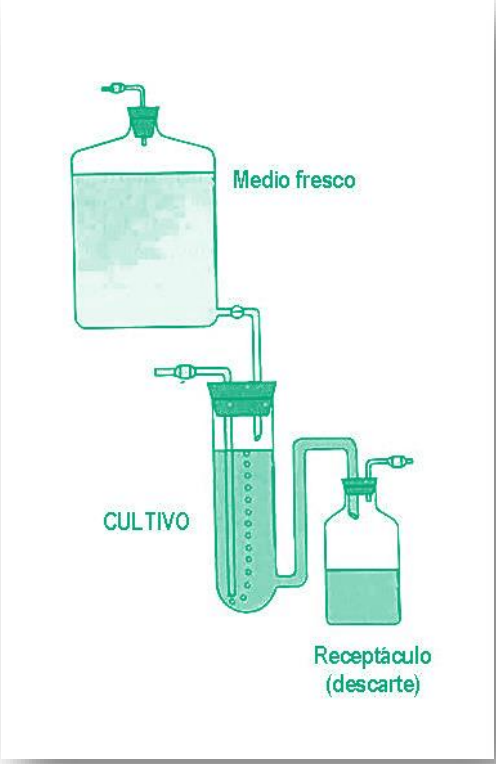
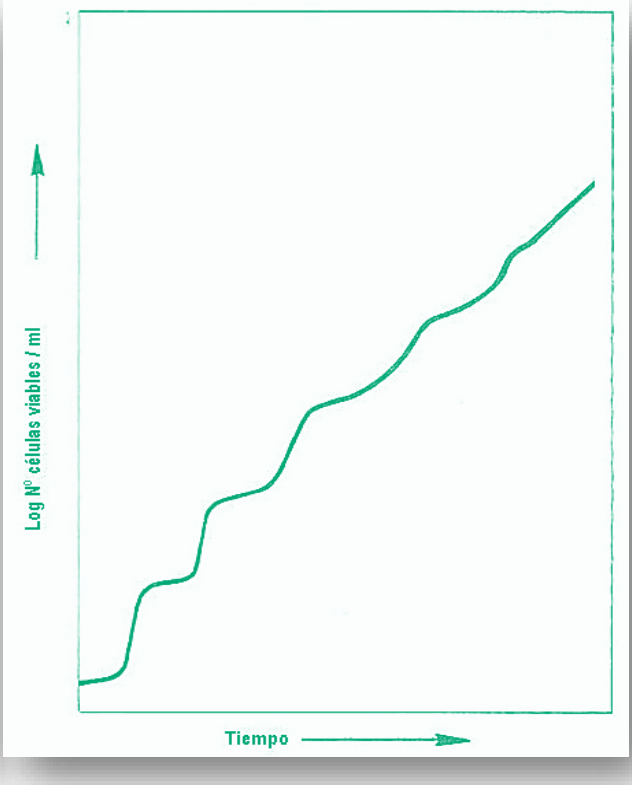


Fig. 10*. Crecimiento de cultivos sincronizados*



Cultivo continuo

Cuando las bacterias se cultivan en un ambiente cuya composición se mantiene constante porque se le agregan continuamente nutrientes y se eliminan productos de desecho, *la población bacteriana se mantiene en fase de crecimiento exponencial y la concentración de masa es constante*. Estas condiciones se alcanzan en el laboratorio a través de un sistema de cultivo continuo, siendo los más usados: 1) quimiostatos y 2) turbidostatos.

1) En un quimiostato se eliminan alícuotas de cultivo que son reemplazadas con la misma velocidad por medio de cultivo fresco que posee un nutriente (por ejemplo, un aminoácido) en concentración limitante

(Figura 9). La velocidad de crecimiento está determinada por la velocidad de incorporación del nutriente limitante y la concentración celular por la concentración de dicho nutriente.

2) Un turbidostato tiene una fotocélula que mide la turbidez del cultivo, regulando la velocidad de flujo del medio para mantener una turbidez predeterminada.

Los sistemas de cultivos continuos son muy útiles para realizar estudios en condiciones que simulan las presentes en ambientes naturales.

Cultivo sincronizado

Hemos dicho que, si bien las bacterias se dividen a intervalos de tiempo regulares, la velocidad de crecimiento de un cultivo en la fase exponencial aparece corrientemente como una función continua. Esto se debe a que todas las bacterias no se dividen simultáneamente. Se pueden obtener *cultivos sincronizados*, en los que las bacterias se dividen al mismo tiempo (Figura 10), modificando propiedades físicas del ambiente o la composición química del medio de cultivo. Por ejemplo, si la temperatura o la concentración de un nutriente esencial son muy inferiores a los valores óptimos, la actividad metabólica será muy baja y las células no se dividirán. Cuando se aumente rápidamente la temperatura de incubación o la concentración del nutriente esencial, las bacterias se dividirán sincronizadamente. También se pueden sincronizar cultivos seleccionando células por tamaño o por edad. Lamentablemente, el estado de sincronización dura muy pocas generaciones, pues los ciclos celulares individuales no tienen la misma duración.

Los cultivos sincronizados permiten estudiar etapas particulares del ciclo celular, que por razones técnicas no es posible realizar.

Bibliografía recomendada

Franco, Mirta *Crecimiento bacteriano*. En Programa de Educación y Actualización Farmacéutica (PROEF). Primer Ciclo – Módulo 3. 1999. Cap. 2, pp. 33-51- Editorial Médica Panamericana. ISSn: 1514-1551.

Franco, Mirta (2006) *Nutrición y Crecimiento bacteriano*. En Microbiología Biomédica, 2ª ed. J.A. Basualdo, C.E. Coto y R.A. de Torres (eds.), pp 83-99. Editorial Atlante SRL. Argentina. ISBN: 950-9539-47-3.

Gerhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Krieg and Phillips. *Manual of Methods for General Bacteriology*, 1981. Cap. 10-11, pp. 65-207. American Society for Microbiology.

Hugo & Russell¨s. *Pharmaceutical Microbiology*. 7th ed. 2004. Cap. 3, pp. 32-38. Edited by Stephen P. Denyer, Norman A. Hodges & Sean P. Gorman. Blakwell Science. ISBN 13: 978-0-632-06467-0.

Prescott – Harley- Klein. *Microbiología*, 5ª ed. 2004. Cap. 6, pp. 118-142. Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. ISBN 84-486-0525-X

Tortora – Funke – Case. *Introducción a la Microbiología*. 9ª edición, 2007. Cap. 6, págs. 159-183. Editorial Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-0740-7

Capítulo I.2.

Fuentes de contaminación microbiana de productos farmacéuticos y cosméticos

María Cristina Fernández

Introducción

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Salmonella sp

Clostridium spp

Hongos filamentosos y levaduras

Candida albicans

Introducción

La contaminación microbiana de los productos farmacéuticos y cosméticos ha sido extensamente estudiada tanto a nivel nacional como internacional. Los productos para administración parenteral y de uso ocular deben ser estériles. Existen otras formas farmacéuticas no obligatoriamente estériles que se usan por vía oral, tópica, nasal, vaginal, etc., fabricadas con ingredientes que pueden ser substratos adecuados para los microorganismos. Las preparaciones farmacéuticas y los cosméticos pueden contaminarse con hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Las materias primas naturales, el equipamiento, el agua, los operadores, el aire, y el material de empaque pueden ser fuentes de contaminación de los productos farmacéuticos y cosméticos [(1)].

La U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) reconoce tres categorías de microorganismos: patógenos, oportunistas y objetables:

Patógenos son aquellos microorganismos o toxinas responsables de enfermar o infectar al hombre (*Salmonella sp, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Clostridium spp,* etc.).

Se consideran **oportunistas** a aquellos microorganismos que producen enfermedad en pacientes inmunocomprometidos.

Y son **objetables** aquellos microorganismos que pueden inactivar drogas activas y/o deteriorar el producto provocando una posible falta de eficacia de los productos farmacéuticos y seguridad en cosméticos; y además según el tipo de pacientes al que el producto está destinado.

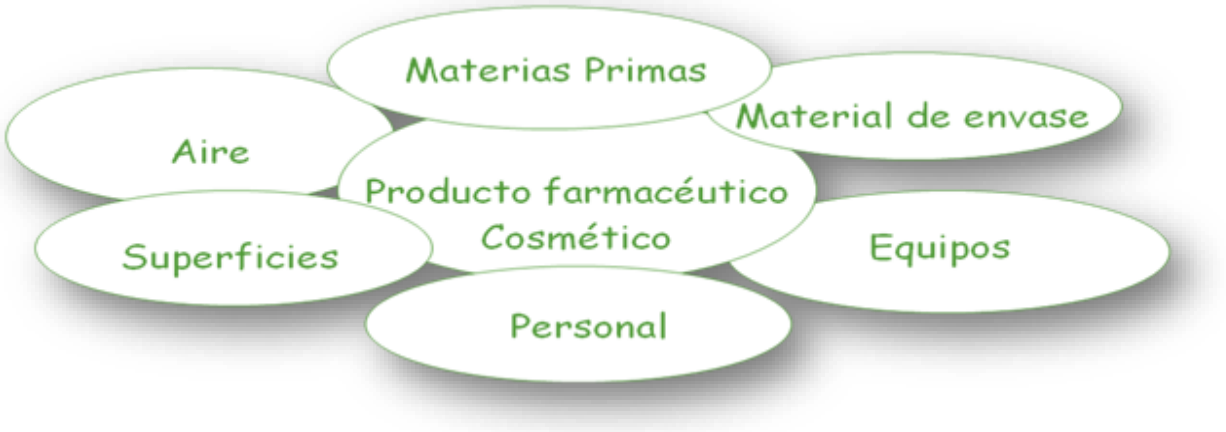
Un medicamento o un cosmético se considera contaminado si contiene microorganismos patogénicos, oportunistas, objetables o metabolitos microbianos tóxicos, o si presentan deterioro físico o químico. Los microorganismos con requerimientos nutricionales simples tienden a estar presentes en alto número, mayor de 10^6 ufc/ g o ml, a pesar de que el producto no muestre signos visibles de contaminación.

La dosis infectiva de los microorganismos no sólo varía entre las especies sino también entre los individuos. Los síntomas y consecuencias de las infecciones por medicamentos o cosméticos contaminados son diversos. Las reacciones clínicas, varían desde una infección local de heridas, infecciones gastrointestinales por productos orales contaminados en el caso de productos no estériles, a infecciones sistémicas serias por productos inyectables contaminados.

Sólo unas pocas materias primas empleadas para la fabricación de productos farmacéuticos son estériles. Controles ambientales, del agua, de las materias primas, de limpieza de equipos y áreas, buenas prácticas de higiene del personal son vitales para minimizar el tipo y número de microorganismos presentes.

En la Figura 1 podemos ver cuáles son las fuentes más comunes de contaminación de medicamentos y cosméticos.

***Figura 1**. Fuentes de contaminación más frecuentes de productos de uso y consumo humano*



Muchos microorganismos pueden llegar a producir toxinas constituyendo un riesgo sanitario especialmente en formas farmacéuticas orales (*Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* y hongos filamentosos) o pueden provocar el deterioro de un producto cosmético o de un medicamento como consecuencia de su crecimiento alterando sus características organolépticas. Otros microorganismos patógenos pueden producir distintas enfermedades en los usuarios dependiendo del grado de contaminación y de la susceptibilidad del consumidor. En general los grupos etarios más sensibles son los lactantes, niños y ancianos.

A continuación, describiremos los microorganismos contaminantes más comúnmente investigados en medicamentos y cosméticos:

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo Gram negativo no fermentador de la glucosa, y es uno de los más importantes patógenos dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* con respecto al número y tipo de infecciones que causa y su relación con la alta morbilidad y mortalidad relacionada [(2)].

Este microorganismo combina perfectamente su adaptabilidad a diferentes ambientes con una gran variedad de factores de virulencia. El espectro de enfermedades causadas por este agente varía desde una infección superficial de piel hasta una sepsis.

La patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* se explica por su gran variedad de factores de virulencia. Un pili polar media la adherencia de este microorganismo a las células epiteliales. Una vez adherida la bacteria produce proteasas, hemolisinas, exotoxinas y endotoxinas que producen daño tisular. El papel de una elastasa, una de las proteasas producida por *P. aeruginosa*, ha sido documentada en su patogénesis de queratitis, infecciones de heridas y enfermedades crónicas de pulmón en pacientes con fibrosis quística [(3)].

El rol de la presencia de una exotoxina A en la patogénesis de las infecciones por *P. aeruginosa* es desconocido, pero esta toxina podría estar asociada con la diseminación de este microorganismo y su toxicidad sistémica [(2)].

Los individuos inmunocomprometidos son las comunidades más afectadas por infecciones por *P. aeruginosa* y las causas están frecuentemente asociadas con contaminación de agua y de soluciones acuosas. La infección superficial más asociada con este microorganismo es la foliculitis e infecciones del canal auditivo.

La infección de *P. aeruginosa* en ojos está frecuentemente asociada al uso de lentes de contacto y de soluciones de lavado de lentes de contacto contaminadas con este microorganismo. Esta infección puede llegar a producir úlceras de córnea que pueden progresar a una pérdida de la función ocular si no es adecuadamente tratada [(4)].

La infección más severa causada por este microorganismo es la endocarditis por administración endovenosa de medicamentos, cuando, al ser inyectados, son disueltos o suspendidos en vehículos acuosos que, si están contaminados con *P. aeruginosa* pueden llegar a producir bacteriemia que puede evolucionar a una endocarditis[(2)].

De ahí la importancia de investigar la presencia de *P. aeruginosa* en productos farmacéuticos que van a ser administrados por vía inhalatoria y ocular como así también en vehículos acuosos.

Los cosméticos también pueden ser vehículo de este microorganismo en especial los líquidos y cremas.

Pseudomonas aeruginosa y otras bacterias Gram negativas pueden colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de *biofilms*. Estas estructuras una vez formadas son muy difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes.

Los *Biofilms* (o biopelículas) son masas de microorganismos vivos o muertos que se acumulan dentro de los reservorios de agua, cañerías u otras superficies inertes como acero inoxidable de equipos y mesadas. Otros organismos o materiales pueden ser atrapados en las láminas del *biofilm*, incluyendo nematodes, algas, bacterias, hongos y depósitos minerales. La densidad bacteriana en el *biofilm* puede estar en el orden de 10^5 a 10^8 ufc/ cm^2.

Durante los últimos años se realizaron estudios genéticos que ayudaron a comenzar a entender el complejo proceso de desarrollo de la formación de un *biofilm*. Ver capítulo de *Biopelículas* en el presente manual.

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* está ampliamente distribuido en la naturaleza, se lo encuentra en la piel y mucosas de humanos y de otros primates. Es frecuentemente encontrado en la boca, sangre, glándulas mamarias, intestino, tracto genitourinario y vías aéreas respiratorias de sus huéspedes. *Staphylococcus aureus* se trata de un coco Gram positivo perteneciente a la familia Micrococcaceae.

Está bien documentado que *S. aureus* es un patógeno oportunista humano y es una de las mayores causas de infecciones agudas y piogénicas; si no es tratada, puede extenderse al tejido circundante o por vía de una bacteriemia a otros órganos. Muchas de las infecciones causadas por *S. aureus* envuelven la piel con episodios de celulitis, impétigo, e infecciones post operatorias en diversos sitios. Otras infecciones mayores en las que está implicado este microorganismo son: bacteriemia, neumonía, osteomielitis, endocarditis aguda, meningitis, abscesos en músculo, entre otros.

La presencia del género *Staphylococcus* y particularmente *S. aureus* en una materia prima o producto farmacéutico o cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana, o sea los operadores. Estos microorganismos pueden ser transportados por el polvo, piel, ropa y microgotas de humedad que se generan al moverse, hablar y estornudar [(5)].

Escherichia coli

El tracto gastrointestinal de los animales contiene siempre microorganismos. Se pueden encontrar microorganismos patógenos reconocidos como *Salmonella* y *Shigella,* y otros microorganismos nativos como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, enterococos, lactobacilos, diversos miembros de la familia Enterobacteriaceae, clostridios y una gran variedad de protozoos.

Los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos que fermentan la glucosa. Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en plantas, suelos y en el intestino de humanos y animales. Están asociados con muchos tipos de infecciones como abscesos, neumonía, meningitis, septicemia e infecciones intestinales, urinarias y heridas.

Escherichia coli es parte de la flora normal fecal de humanos y animales inferiores, Sin embargo, algunas cepas pueden producir infecciones del tracto urinario, de heridas y entéricas, ocasionalmente pueden producir septicemia

y meningitis. Las cepas de *E. coli* más importantes que pueden causar episodios severos de diarrea se detallan en la Tabla 1.

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por presentación aguda de daño renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, que puede afectar otros parénquimas como intestino, páncreas, corazón y sistema nervioso central. Esta enfermedad sindrómica puede presentar dos formas, una típica de etiología infecciosa y de características endemoepidémicas, que está precedida por un período prodrómico con diarrea, generalmente sanguinolenta, y que puede presentar además fiebre, vómitos y dolor abdominal. La forma atípica puede ser desencadenada por distintos cuadros como neoplasias, hipertensión arterial, rechazo de trasplante renal, uso de anticonceptivos orales, drogas, post parto, etc.

Tabla 1: *Propiedades de las distintas E. coli que pueden causar infecciones entéricas*

Cepa	Mecanismo patogénico	Infección entérica	Presentaciones clínicas comunes	Grupo etario más común	Factor de riesgo más común
ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénico)	LT y ST Toxinas	Diarrea del viajero	Diarrea acuosa, dolores abdominales, náuseas, deshidratación	Adultos y niños	Viajes
EPEC (*Escherichia coli* enteropatógeno)	Adherencia	Diarrea aguda	Diarrea acuosa, fiebre, vómitos, mucus en heces	Niños menores a 2 años de edad y adultos	Edad menor a dos años
EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasivo)	Invasión y destrucción de la mucosa del epitelio intestinal	Disentería similar a la de *Shigella dysentery*	Disentería, sangre mucus y leucocitos en heces, fiebre, dolores abdominales	Adultos	Viajes
EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágico)	Toxinas *shiga-like*	Diarrea, colitis hemorrágica	Diarrea, dolores abdominales, sangre en heces, SUH (Síndrome urémico hemolítico)	Niños y ancianos	Consumo de carne cruda o mal cocida
EAggEC (*Escherichia coli* enteroagregativo)	Descono-cido	Diarreas agudas y crónicas	Diarrea acuosa y vómitos	Todas las edades	Desconocido

Se ha reconocido a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), como agente causal de la forma postentérica de SUH. Otros agentes infecciosos como *Shigella dysenteriae* tipo 1, *Campylobacter* sp., *S. pneumoniae*, entre otros, han sido asociados a casos de SUH. *Escherichia coli* O157:H7, identificado por primera vez como patógeno humano en 1982, es el serotipo prevalente asociado a grandes brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica (CH) y SUH. Sin embargo, más de 100 serotipos poseen un potencial patogénico similar. A un subgrupo de serotipos de STEC (O26:H11; O103:H2; O111:NM; O121:H19; O145:NM; O157:H7), asociado a enfermedad severa en el hombre, se lo denomina *E. coli* enterohemorrágico. Se han clasificado a las cepas STEC en cinco sero-patotipos (A-E) teniendo en cuenta su potencial patogénico y epidémico, su asociación a enfermedades severas en el hombre y su capacidad para producir brotes [6].

Su presencia en un producto de uso o consumo humano implicaría una posible presencia de contaminación fecal en especial en productos de consumo oral y en materias primas de origen natural.

El género *Salmonella*

Salmonella sp., es un miembro de la familia Enterobacteriaceae que puede causar muchos tipos de infecciones, desde una gastroenteritis autolimitante hasta afecciones generalizadas como la fiebre tifoidea y paratifoidea. Son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Se distinguen más de 2000 serotipos según una clasificación basada en antígenos somáticos (O) y flagelares (H), conocido como esquema de Kauffmann- White. Sin embargo, las salmonelas que afectan al hombre constituyen un número reducido. La enfermedad más común producida por el género Salmonella es la enterocolitis autolimitante con episodios febriles y diarrea generalmente con una duración de siete días.

Una vez que se han ingerido las salmonelas con un producto contaminado, pasan a través del estómago y comienzan a multiplicarse y se adhieren al borde en cepillo de las células epiteliales que tapizan la porción distal del intestino delgado. Luego las bacterias penetran en las células de la mucosa que resulta dañada, y migran a la lámina propia de la región ileocecal. Tras una posterior multiplicación en los folículos linfoideos se desarrolla una respuesta leucocítica seguida de hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Esta respuesta inflamatoria también induce la liberación de prostaglandinas, que estimulan el cAMP y produce una activa secreción de fluidos que se manifiesta en una diarrea profusa. Típicamente el período de incubación es de aproximadamente 12 a 36 horas.

Las salmonelas se encuentran ampliamente difundidas en la naturaleza y como flora normal del tracto intestinal de animales y humanos. Se distinguen de otros microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales en que su presencia puede ser habitual en materias primas de origen natural, en especial aquellas de origen animal. Posee una gran habilidad de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas, alcanzando recuentos muy elevados. Pueden ser fácilmente diseminadas y transmitidas de una persona a otra. Puede producirse un prolongado período de excreción del microorganismo tras la infección produciéndose lo que se conoce como estado de portador.

Dada la etiología de este microorganismo es de fundamental importancia su investigación en materias primas de origen natural.

***Clostridium* spp**

Las bacterias anaerobias producen todo tipo de enfermedades al igual que las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, y pueden pasar inadvertidas en el diagnóstico si no se emplean técnicas adecuadas.

Las bacterias anaerobias son las que no requieren oxígeno como aceptor terminal de electrones para su desarrollo o actividades metabólicas. Si bien pueden poseer ciertos citocromos, los anaerobios carecen de los citocromos que se requieren para transferir electrones al oxígeno molecular; por lo que su energía proviene de reacciones de fermentación.

Están ampliamente distribuidas en los medios naturales, fundamentalmente en el suelo o ambientes relacionados con polvo ambiental que poseen una baja tensión de oxígeno y bajo potencial redox. En el ser humano las bacterias anaerobias residen como flora normal en la piel y mucosas de nasofaringe, orofaringe, boca, tracto gastrointestinal, uretra y vagina. Con pocas excepciones, como por ejemplo el *Clostridium botulinum*, las bacterias anaerobias patógenas son parte de la flora normal en uno o más de los sitios nombrados y pueden ser patógenos oportunistas. El *Clostridium perfringens* habita en el tracto gastrointestinal y puede hallarse en la piel perianal de individuos sanos.

Las infecciones por anaerobios pueden afectar cualquier región del cuerpo, siempre que las condiciones en los tejidos sean favorables. Los anaerobios están comúnmente involucrados en abscesos de cualquier órgano, colitis, apendicitis, bacteriemia, otitis media crónica, celulitis crepitante, infecciones dentales y orales, endocarditis y endometritis.

El género *Clostridium* está formado por un grupo heterogéneo de bacilos grampositivos anaerobios esporoformadores. Está ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en el suelo y en el tracto intestinal de muchas especies animales incluido el hombre, y puede causar infecciones de origen exógeno y de origen endógeno. En la actualidad se han descrito más de 150 especies, aunque sólo alrededor de 30 han sido asociadas con infección humana, siendo *Clostridium perfringens* la especie más frecuente.

Diversas afecciones de piel y tejidos blandos están asociadas con especies de *Clostridium*. Las más características y graves son la celulitis por *Clostridium* o celulitis crepitante y la mionecrosis por *Clostridium* o gangrena gaseosa.

La celulitis crepitante es una infección que afecta característicamente a los tejidos subcutáneos o retroperitoneales donde el músculo no está envuelto en una extensión significativa y permanece viable. Los hallazgos en el lugar de la infección incluyen crepitación a la palpación por la presencia de gas, a menudo más abundante que en la mionecrosis, dolor mínimo, edema, ligera decoloración de la piel y exudado oscuro, frecuentemente maloliente, que en la tinción de Gram suele mostrar células bacterianas típicas y abundantes neutrófilos. Con un periodo de incubación de 3 días o más y con mínima toxicidad.

La gangrena gaseosa es una infección que puede surgir principalmente después de un traumatismo, como complicación de una herida penetrante y extensa, usualmente en una extremidad y con gran afectación de la masa muscular, o bien como complicación de una cirugía, principalmente de colon o tracto biliar, o después de un aborto séptico, parto u otra manipulación obstétrica. El traumatismo introduce al microorganismo, en su forma vegetativa o sus esporas, en los tejidos profundos y produce un ambiente anaerobio que favorece el crecimiento de éste y la producción de sus toxinas.

El *Clostridium botulinum* es un bacilo Gram positivo, anaerobio obligado y formador de endosporas. Produce neurotoxinas con una dosis letal mínima entre 0,1 y 1,0 microgramos que se destruyen con unos pocos minutos de hervor. La neurotoxina se absorbe, se asocia a la unión neuromuscular de los nervios afectados e inhibe la liberación de acetilcolina provocando una parálisis neuromuscular con fallo respiratorio en 24 horas. Los principales síntomas del botulismo aparecen generalmente entre 12 y 36 horas después de la ingesta de un producto contaminado. Sin embargo, en ciertos casos, el período de incubación puede prolongarse a 8 días dependiendo en gran parte de la dosis de toxina ingerida. Se observan vértigos, dificultad para tragar, voz pastosa, debilidad en los miembros y visión borrosa. Los problemas respiratorios son causados por la parálisis respiratoria que puede conducir a la muerte por simple asfixia.

Se han identificado otros dos tipos de botulismo conocidos como botulismo de las heridas y botulismo infantil.

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

Hongos filamentosos y levaduras

Muchos hongos saprófitos, mohos y levaduras ambientales suelen estar ligados a contaminaciones de medicamentos y cosméticos.

Los hongos son organismos eucariotas, es decir que presentan núcleo verdadero con membrana nuclear y cromosomas. Esta característica los distingue de las bacterias, organismos procariotas sin núcleo y con un solo cromosoma libre en el citoplasma.

Desde el punto de vista nutricional son heterótrofos, al igual que los animales, ya que no sintetizan la materia orgánica a partir de CO_2. Los hongos requieren, a diferencia de las plantas, de fuentes de carbono orgánicas, pero a diferencia de los animales debido a la pared que presentan por absorción de nutrientes solubles en lugar de hacerlo por ingestión de alimentos particulados seguida de digestión. Los hongos digieren los alimentos externamente liberando enzimas y ácidos que hidrolizan las macromoléculas del sustrato y absorben las subunidades (nutrición absortiva).

Los hongos patógenos aislados con más frecuencia son cepas de *Aspergillus* y *Candida*.

Aspergillus fumigatus y *Aspergillus flavus* son mohos que producen micosis sistémica en pulmón llamada Aspergillosis.

La levadura *Candida albicans,* que es huésped normal de la flora intestinal del hombre, produce candidiasis superficial o sistémica en personas debilitadas, en recién nacidos y en ancianos con sistema inmunológico deficiente.

Los hongos saprófitos oportunistas, tanto mohos como levaduras, pueden producir alergias y micosis secundarias comportándose como verdaderos patógenos.

Los hongos toxicogénicos son frecuentes en todo tipo de productos siendo los más importantes *A. flavus* y *A. parasiticus*, productores de aflatoxinas. Las aflatoxinas, metabolitos secundarios hepatotóxicos y potentes carcinogénicos, deben ser consideradas como indicadoras de riesgo tóxico. El empleo de decontaminantes, si bien garantiza la ausencia de estos hongos toxicogénicos, no asegura la destrucción de la toxina porque estos metabolitos son resistentes al calor y a los tratamientos que reciben las materias primas de origen natural como por ejemplo la descontaminación por radiación ionizante.

Los productos más susceptibles a la contaminación fúngica son las soluciones oftálmicas, ungüentos, supositorios, pomadas y en cosméticos, jabones y talcos, y otros que contienen nutrientes ricos en hidratos de carbono y ácidos grasos. Los excipientes y materias primas derivados de cereales son también óptimos sustratos para el desarrollo de cepas de *A. flavus,* productores de aflatoxinas. Las hierbas medicinales y medicamentos fitoterápicos pueden ser vehículos también de estos microorganismos.

Candida albicans: Las levaduras son esencialmente hongos unicelulares que, aunque son morfológicamente simples constituyen un grupo altamente especializado asociados con ambientes nutricionales muy dispares. Unas pocas especies de levaduras son potencialmente patógenas para el hombre, aunque muchas están relacionadas con procesos de alteración de producto.

Candida albicans es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprófito de la familia de los Sacaromicetos. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Puede asumir patogenenicidad provocando candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del tracto gastrointestinal, o de la piel.

BIBLIOGRAFIA

1. Bomblies, L.; WeiB, C. and Beckmann, G. *Examination of Microbiological Quality of Pharmaceutical Raw Materials*. Pharmeuropa Scientific notes 2007-1; 1-7.
2. Pollack, M. 1990. *Pseudomonas aeruginosa*, p 1673-1691. In *Principles and Practice of Infections Diseases*. G.L. Mandell, R.G. Douglas Jr., and J. E. Bennett (ed) 3rd ed. Churchill Livingstone, New York.
3. Holder, I.A. 1993. *Pseudomonas aeruginosa virulence associated factors and their role in burn wound infections*, p. 235-245. In *Pseudomonas aeruginosa*: *the Opportnist*. R.B. Fick Jr. Ed. CRC. Press, Inc, Boca Raton, Fla.
4. Holland, S.P., Pulido J.S., Shires T.K., and Costerton J.W. 1993. *Pseudomonas aeruginosa ocular infections*, p 159-176. In *Pseudomonas aeruginosa*: *the Opportunist*. R.B. Fick Jr. (ed), CrC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
5. Wesley E. Kloods and Tammy L. Bannerman. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, 2005. Chapter 22. p 282-293. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Avenue N.W. Washington DC. 2005.
6. Rivas, M., Miliwebsky, E; Chinen, Isabel, Deza, N., Leotta G. *Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina*. MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66 (Supl. III): 27-32.

Capítulo I.3

Medios de cultivo

Héctor Cerra

Introducción

Clasificación

Recepción

Preparación

Etiquetado

Esterilización

Almacenamiento

Control de esterilidad

Test de promoción de crecimiento

Documentación

Validación de la fecha de vencimiento

Bibliografía consultada

Introducción:

Un medio de cultivo es aquella preparación que contiene los nutrientes necesarios para recuperar, multiplicar, aislar e identificar los microorganismos bajo las condiciones favorables de temperatura y pH. Debido a la variabilidad de los resultados microbiológicos, el tema de los medios de cultivo juega un rol importante, junto a otros principios, dentro de las buenas prácticas de un laboratorio de Microbiología. Ya que un medio de cultivo es la base para la mayoría de los análisis microbiológicos, todo lo referente a su calidad es crítico para el éxito de un laboratorio de Microbiología. Es también uno de los puntos clave que requieren gran atención en la Inspecciones y Auditorías porque si los medios de cultivo no están apropiadamente preparados y controlados, los resultados del laboratorio pueden ponerse en duda.

El desarrollo adecuado de los microorganismos en un medio de cultivo se ve afectado por una serie de factores de gran importancia y que, en algunos casos, son completamente ajenos al propio medio:

1. *Disponibilidad de nutrientes adecuados*

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. Todas estas sustancias se suministraban originalmente en forma de infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura. Sin embargo, la preparación de estas sustancias para su aplicación a los medios de cultivo provocaba la pérdida de los factores nutritivos lábiles. Actualmente, la forma más extendida de aportar estas sustancias a los medios es utilizar peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón ya que la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en la peptona.

Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añaden sustancias como suero, sangre, etc. Igualmente pueden ser necesarios ciertos carbohidratos y sales minerales como las de calcio, magnesio, manganeso, sodio o potasio y sustancias promotoras del crecimiento, generalmente de naturaleza vitamínica.
Muy a menudo se añaden al medio de cultivo ciertos colorantes, bien como indicadores de ciertas actividades metabólicas o por sus capacidades de actuar como inhibidores selectivos de ciertos microorganismos.

2. Consistencia adecuada del medio

Partiendo de un medio líquido podemos modificar su consistencia añadiendo productos como albúmina, gelatina o agar, con lo que obtendríamos medios en estado semisólido o sólido. Los medios solidificados con gelatina tienen el gran inconveniente de que muchos microorganismos no se desarrollan adecuadamente a temperaturas inferiores al punto de fusión de este solidificante y además otros tienen la capacidad de licuarla.

Actualmente los medios sólidos son de uso universal, por su versatilidad y comodidad, pero hay también gran cantidad de medios líquidos cuyo uso está ampliamente extendido en el laboratorio, sobre todo para etapas de enriquecimiento.

3. Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos sólo desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. En un punto intermedio, los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias (tensión de oxígeno muy reducida), mientras que los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones.

4. Condiciones adecuadas de humedad

Un nivel mínimo de humedad, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos.

Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo sobre todo cuando la temperatura de incubación es mayor a 35° C, o cuando los tiempos de incubación son prolongados, cuando sea necesario que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseque el medio.

5. Luz ambiental

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos.

6. pH.

La concentración de iones hidrógeno es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos. No se debe olvidar que la presencia de ácidos o bases en cantidades que no impiden el crecimiento bacteriano pueden sin embargo inhibirlo o incluso alterar sus procesos metabólicos normales.

7. Temperatura

Los microorganismos mesófilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 40 ºC. Otros como los psicrófilos crecen a menos de 15 °C e incluso a 0 °C, y los termófilos a más de 40 °C e incluso a 80 °C, o incluso a temperaturas superiores (hipertemófilos).

En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más reducidos, alrededor de 37 ºC, y los saprófitos desarrollan en rangos más amplios.

8. Esterilidad del medio

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles:
- para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios.
- para que el resultado obtenido sea el correspondiente al nivel de contaminación de la muestra a analizar.

Clasificación:

A continuación clasificaremos los medios de cultivo según su consistencia, su utilización, su composición y su origen:

1. Según su consistencia (estado físico):

Según su consistencia, los medios de cultivo pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos.

1.1. *Medios líquidos:* Como se presentan en ese estado son llamados también caldos.

1.2. *Medios sólidos:* Se preparan a través de medios líquidos agregándoles un agente gelificante. Los más utilizados con la gelatina y el agar.
La gelatina es una proteína animal obtenida de los huesos. Tiene la limitación de que es hidrolizada por muchas bacterias y porque su punto de fusión es bajo.
El agar agar es un polímero de azúcares obtenido de algas marinas. Es una molécula insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente. Una solución de 1,5 % forma un gel firme al ser enfriado a temperatura entre 32 y 45 °C.

1.3. *Medios semisólidos:* Se preparan a partir de los medios líquidos agregándoles un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus principales usos es para la investigación de la movilidad de los microorganismos. Poseen 0,15 % de agar.

2. Según su utilización:

Según su utilización los medios de cultivo pueden clasificarse en medios comunes, medios de enriquecimiento, selectivos, diferenciales, de identificación, de conservación y de transporte.

2.1 *Medios comunes:* Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de microorganismos que no necesiten requerimientos especiales. El más conocido es el agar nutritivo o agar común, resultante de la adición de agar al caldo nutritivo.

2.2. *Medios de enriquecimiento:* Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes o fastidiosos. Este enriquecimiento se hace por agregado de, por ejemplo: sangre, leche, bilis, huevo, etc.

2.3. *Medios selectivos:* Son aquellos utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias inhibiendo el desarrollo de otras, ya que poseen una sustancia inhibitoria. Ejemplo: el agar Mac Conkey posee sales biliares y cristal violeta que inhiben las bacterias Gram positivas.

2.4. *Medios diferenciales:* Se utilizan para poner en evidencia características bioquímicas que ayuden a diferenciar géneros o especies. Contienen compuestos químicos o indicadores sobre los que determinados microorganismos adquieren coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada. Ejemplo: el agar EMB tiene eosina y azul de metileno que nos permite diferenciar *Escherichia coli* la cual forma colonias verdes (con brillo metálico a la luz reflejada), de otras enterobacterias que forman colonias de color rosa salmón.

2.5. *Medios de identificación:* Son aquellos que se utilizan para poner en evidencia alguna cualidad bioquímica que nos permite reconocer la identidad de un microorganismo. Ejemplo: el Agar Kligler que permite determinar la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico, con producción o no de gas, junto con la posible producción de ácido sulfhídrico.

2.6. *Medios de conservación:* Se utilizan para conservar una cepa microbiana.

2.7. *Medios de transporte:* Se usan por ejemplo para el transporte de muestras clínicas e hisopos que fueron utilizados en el control de superficies que no pueden sembrarse inmediatamente. Ejemplo: medio Cary Blair el cual es especialmente útil para la búsqueda de *Vibrio* spp. a partir de muestras rectales.

3. Según su composición:

Según su composición los medios de cultivo pueden ser complejos o indefinidos, sintéticos o definidos, o semisintéticos:

3.1. *Medios complejos o indefinidos:* Son aquellos cuya composición química exacta se desconoce ya que son el producto de realizar infusiones y extractos de materiales naturales complejos. Son medios muy ricos nutricionalmente, aunque indefinidos químicamente. Ejemplo: digeridos de extracto de carne o extracto de levadura.

3.2. *Medios sintéticos o definidos:* Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida.

3.3. Medios semisintéticos: Es una mezcla de los medios anteriores. Llevan algunas sustancias químicas cuya naturaleza y cantidad conocemos, junto con sustancias de naturaleza y composición indefinidas.

Presentación del medio de cultivo deshidratado:

Los medios de cultivo por lo general son mezclas de polvos, como lo son cada uno de sus ingredientes. Pero también existen algunos medios de cultivo deshidratados que se elaboran como granulados. Algunos recomiendan el uso de medios de cultivo granulados ya que ofrecen ciertas ventajas, según sus fabricantes. Estas ventajas son:

1) la escasa liberación de partículas (polvo) durante la manipulación, reduce la respiración de sustancias tóxicas.
2) la mayor fluidez del producto impide su adherencia a las paredes de los recipientes resultando más fácil la pesada.
3) se humectan fácilmente acelerando el proceso de suspensión o disolución no formándose grumos difícilmente solubles.
4) cuando el almacenamiento del medio de cultivo deshidratado es prolongado, la distribución física de los componentes se ve facilitada.
5) la conservación del medio se ve favorecida por el escaso contenido de humedad.

Recepción:

Durante la recepción de los medios de cultivo en el laboratorio, tener especial precaución en:

a) Registrar en cada envase la fecha de ingreso al laboratorio (día, mes y año).

b) Registrar en cada envase el número que identifica al medio de cultivo y que ha sido previamente asignado en el laboratorio.

c) Identificar cada envase con el número de envase y número total de envases recibidos (ejemplo: 1 de 9, 2 de 9, etc.)

d) Archivar el Certificado de Análisis del medio recepcionado, verificando que el mismo coincida con el nombre del medio de cultivo y con el número de lote ingresado.

e) Almacenar el o los envases de acuerdo con las recomendaciones del Fabricante que figuran en la etiqueta del envase o en el Certificado de análisis o en la Hoja de Seguridad.

f) Conservar los envases en lugar seco, protegidos de la luz, a una temperatura entre 15 y 25 °C, o a la temperatura indicada en el envase del medio. Los envases deben estar siempre bien cerrados.

g) En la etiqueta del envase se indica su fecha de vencimiento.

Preparación:

Los medios de cultivo se pueden preparar a partir de los componentes primarios, o pueden adquirirse deshidratados o listos para usar.

A continuación se enumeran algunas precauciones que deben tenerse en cuenta durante la elaboración de los medios:

- La balanza a utilizar en la pesada del medio deshidratado o de sus ingredientes debe estar calibrada en frecuencia establecida en el Plan Maestro de Calibraciones del Laboratorio, y diariamente antes de usar debe realizarse un control con una pesa asignada.
- Los recipientes a utilizar en la preparación y envasado de los medios deben estar limpios, ya que residuos de detergentes o restos de otras sustancias que se hallen por lavado deficiente, puede causar efecto inhibitorio en la capacidad de crecimiento de los microorganismos.
- Los recipientes destinados a la preparación de medios de cultivo deben ser lo suficientemente grandes para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad, y los destinados al envasado para que durante la esterilización por autoclave no haya derrame de medios de cultivo o rotura de frascos.
- Las espátulas, cucharas y agitadores utilizados para la elaboración del medio deben estar limpios.
- El agua para disolución de los medios debe ser Agua Purificada o Destilada.
- Cuando el envase de medio de cultivo se abre por primera vez deberá anotarse, cerca de la fecha de ingreso, la fecha de apertura (día, mes y año).
- Para la selección del envase a abrir usar el concepto FIFO (*First In First Out* = primero en entrar primero en salir) y el concepto FEFO (*First Expiry First Out* = primero en vencer primero en salir).
- Verificar que el medio de cultivo no se encuentra vencido ni tenga signos de humedad. En caso de que esto suceda, descartarlo y utilizar otro envase.
- Agitar el envase para favorecer la mezcla de sus componentes.
- Pesar exactamente la cantidad deseada de acuerdo al volumen total a preparar, siguiendo las indicaciones descriptas en la etiqueta del envase.
- Extraer de la impresora el registro de la pesada y pegarlo en el *Notebook* o formulario correspondiente.
- Cerrar herméticamente el envase del medio de cultivo pesado (para evitar absorción de humedad, oxidación y/o contaminación) y guardarlo en su correspondiente lugar de almacenamiento.
- Rehidratar con el volumen correcto de agua. Para ello, primero es conveniente agregar aproximadamente la mitad de la cantidad de agua necesaria y agitar suficientemente para conseguir una suspensión homogénea; luego incorporar la cantidad de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridas a la pared.
- Calentar el medio cuando es indicado por el fabricante. Por lo general los medios líquidos pueden necesitar calentamiento sólo cuando es necesario disolver completamente; y los medios agarizados necesitan calentar hasta ebullición.
- Cuando aplique, fraccionar en los recipientes correspondientes. Si se usa un dispensador automático, el mismo debe estar calibrado en frecuencia establecida en el Plan Maestro de Calibraciones del Laboratorio.
- Medir el pH (Ver Metodología aparte) antes de su esterilización y ajustarlo en caso de ser necesario. Registrar el valor obtenido.

- Tapar y etiquetar cada recipiente con el nombre del medio de cultivo, número de ciclo en el cual se esterilizará y fecha de vencimiento.
- El medio de cultivo puede ser elaborado en equipos preparadores y fraccionadores de medios, o en reactores en los cuales los parámetros de velocidad de agitación, tiempo y temperatura puede ser seteados. Sólo en el caso de empleo de estos métodos se puede validar el proceso de producción del medio de cultivo.

Metodología para la medición del pH:

Si bien cuando se utiliza agua neutra para su preparación los medios de cultivo muestran un valor correcto de pH, se recomienda comprobar el mismo y proceder su corrección en caso necesario. Para la toma del pH se recomienda usar un peachímetro.

El pH a cumplir que indica el fabricante del medio de cultivo es el medido una vez que el medio ha sido esterilizado. El mismo depende del tratamiento de esterilización o de calentamiento a que haya sido sometido el medio de cultivo.

Para asegurar un pH final correcto, es necesario tomar el valor de pH antes de la esterilización, y en caso necesario ajustarlo añadiendo cantidad suficiente de NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N, o lo que indique el fabricante del medio de cultivo deshidratado.

Se puede usar un electrodo combinado, pero para la medición del pH de un medio de cultivo sólido, es conveniente el uso de un electrodo plano de superficie.

Etiquetado:

Cada recipiente de medio de cultivo elaborado en el laboratorio debe etiquetarse con los siguientes datos:

- Nombre o abreviatura del medio de cultivo.
- Identificación del *batch* de medio elaborado
- Fecha de vencimiento.

Esterilización:

Todos los medios de cultivo que lo requieren deben ser esterilizados el mismo día de la preparación y preferentemente dentro de las dos horas.

Deben seguirse las recomendaciones del fabricante, típicamente se usa 121 °C durante 15 minutos, utilizando un autoclave calificado y ciclos validados. Sin embargo algunos medios de cultivo pueden requerir esterilización por vapor fluente o a temperaturas menores como 115 ºC para evitar el deterioro de componentes lábiles al calor. Algunos medios líquidos pueden esterilizarse por filtración.

Respecto a la validación de los ciclos de esterilización, para garantizar la correcta distribución de calor, hay varias recomendaciones teniendo en cuenta la carga dentro de la cámara del autoclave:

- Si existen variaciones en el tamaño de la carga, deben ser identificadas cargas mínimas y máximas.
- Antes de comenzar con los estudios de penetración de calor, deben ser establecidas las configuraciones de cargas máximas y mínimas.
- Las configuraciones de las cargas deben ser documentadas y sólo cargas autorizadas deben ser usadas.

En los ciclos de esterilización en los cuales se tarda mucho en alcanzar la temperatura deseada puede ocasionar sobrecalentamiento con el consiguiente deterioro del medio de cultivo: reducción en la capacidad de crecimiento o selectividad de los microorganismos, cambio de color por browning no enzimático, pérdida de claridad, alteración de la consistencia del agar, cambio de pH, etc.

Almacenamiento:

El almacenamiento de los medios de cultivo preparados debe realizarse siguiendo las indicaciones del fabricante. Por ejemplo, algunos se almacenan a temperatura ambiente, otros refrigerados (principalmente aquellos que contienen sangre, yema de huevo, telurito, etc.), o al abrigo de la luz, o en ambiente con humedad controlada, etc.

Siempre se debe asegurar, mediante *datalogger* u otra forma de registro, que el lugar de almacenamiento se encuentre dentro del rango de temperatura establecido.

Respecto a la fecha de vencimiento de los medios de cultivo esterilizados se deben seguir las recomendaciones del fabricante. Si el fabricante no establece el período de vigencia, éste debe ser establecido en el laboratorio después de su validación, como se verá más adelante.

Control de esterilidad:

Se recomienda preincubar una muestra de los medios de cultivo o una porción de sus envases, a 30-35 °C durante no menos de 3 días para asegurar la esterilidad del medio de cultivo elaborado.

Test de promoción de crecimiento:

Se debe controlar cada lote de medio de cultivo preparado para los ensayos microbiológicos, verificando que los medios presentan las propiedades adecuadas como se describe en la Tabla 1.

1) Para determinar las propiedades de fertilidad de un medio líquido:

   Sembrar en una porción del medio como máximo 100 UFC del microorganismo apropiado.
   Incubar no menos de 3 días a 30–35 ºC para el caso de bacterias y no menos de 5 días a 20–25 ºC para el caso de hongos y levaduras.
   Se observa un crecimiento claramente visible del microorganismo comparable con el obtenido con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

2) Para determinar las propiedades de fertilidad de un medio sólido:

   Sembrar en una porción del medio como máximo 100 UFC del microorganismo apropiado.
   Incubar no menos de 3 días a 30–35 ºC para el caso de bacterias y no menos de 5 días a 20–25 ºC para el caso de hongos y levaduras.
   El crecimiento obtenido no debe diferir en un factor de 2 respecto del obtenido con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

3) Para determinar las propiedades de inhibición de un medio líquido o sólido:

   Sembrar en una porción del medio como mínimo 100 UFC del microorganismo apropiado.
   Incubar a la temperatura adecuada durante, como mínimo, el mayor tiempo de período especificado en el ensayo.
   No se observa crecimiento del microorganismo de ensayo.

4) Para determinar las propiedades indicativas:

   Sembrar en una porción del medio como máximo 100 UFC del microorganismo apropiado.
   Incubar a la temperatura especificada durante, como mínimo, el menor tiempo de período especificado en el ensayo.
   El aspecto y las reacciones bioquímicas indicadoras de las colonias son comparables con los de las obtenidas con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

Tabla 1. *Propiedades de fertilidad, inhibición e indicativas del crecimiento en los medios*

Ensayo	Medio	Propiedad	Cepas de ensayo
Ensayo para detectar bacterias Gram-negativas resistentes a las sales biliares	Caldo para enriquecimiento en enterobacterias de Mossel	Ensayo de fertilidad	*E. coli* *P. aeruginosa*
		Inhibición	*S. aureus*
	Agar violeta cristal, rojo neutro, sales biliares y glucosa	Ensayo de fertilidad + indicación	*E. coli* *P. aeruginosa*
Ensayo para detectar *Escherichia coli*	Caldo de MacConkey	Ensayo de fertilidad	*E. coli*
		Inhibición	*S. aureus*
	Agar de MacConkey	Ensayo de fertilidad + indicación	*E. coli*
Ensayo para detectar *Salmonella*	Caldo para enriquecimiento en salmonelas de Rappaport y Vassiliadis	Ensayo de fertilidad	*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Typhimurium* o *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Abony*
		Inhibición	*S. aureus*
	Agar xilosa, lisina y desoxicolato	Ensayo de fertilidad + indicación	*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Typhimurium* o *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Abony*
Ensayo para detectar *Pseudomonas aeruginosa*	Agar cetrimida	Ensayo de fertilidad	*P. aeruginosa*
		Inhibición	*E. coli*
Ensayo para detectar *Staphylococcus aureus*	Agar manitol-sal	Ensayo de fertilidad + indicación	*S. aureus*
		Inhibición	*E. coli*
Ensayo para detectar clostridios	Medio reforzado para clostridios	Ensayo de fertilidad	*Cl. Sporogenes*
	Agar Columbia	Ensayo de fertilidad	*Cl. Sporogenes*
Ensayo para detectar *Candida albicans*	Caldo glucosado de Sabouraud	Ensayo de fertilidad	*C. albicans*
	Agar glucosado de Sabouraud	Ensayo de fertilidad + indicación	*C. albicans*

Documentación:

Es crucial la trazabilidad en la preparación de los medios de cultivo, por lo tanto se debe registrar toda la información posible:

- Fecha de preparación.
- Responsable de preparación.
- Marca comercial del medio de cultivo deshidratado.
- Lote y vencimiento del medio de cultivo deshidratado.
- *Batch* del lote preparado
- Peso teórico.
- Registro de la pesada.
- Balanza utilizada.

- Total del volumen a preparar.
- En caso de fraccionamiento posterior indicar el número de recipientes y el volumen fraccionado por recipiente.
- pH antes y después del ajuste (si lo hubo).
- pH después de la esterilización.
- Peachímetro utilizado.
- Identificación del ciclo de esterilización

Los registros de datos crudos deben ser legibles e indelebles. No deben completarse con lápiz.

Todos estos datos deben documentarse en un *Notebook* o formulario. El mismo debe ser revisado por una segunda persona siguiendo el principio del doble control: una segunda persona controla y firma que los datos ingresados y los cálculos realizados sean los correctos.

Las hojas del *Notebook* deben estar correctamente numeradas y debe constar el número total de las mismas.

Si se usan hojas de análisis preimpresas provenientes de un sistema informático deberán estar compiladas o encuadernadas, numeradas con el formato 1 de n páginas.

Validación de la fecha de vencimiento:

La fecha de vencimiento y las condiciones de almacenamiento deben ser validadas.

El laboratorio debe crear un protocolo que incluya los siguientes ensayos: pH, apariencia, esterilidad y test de promoción de crecimiento a ser llevados a cabo al menos en tres lotes de cada medio de cultivo al cabo de la fecha de vencimiento establecida.

Otra manera de asegurar que el tiempo fijado como vigencia es el correcto, es efectuar el control de calidad del medio de cultivo nuevo recientemente elaborado, en paralelo con el anterior que está en uso. De esa manera se puede asegurar que todos los ensayos realizados con el medio anterior se han efectuado con un medio que cumple con los criterios de calidad establecidos.

Bibliografía consultada:

1. *Quality Control Systems for the Microbiology Laboratory: The Key to Successful Inspections.* Lucía Clontz.
2. *Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation Approaches and Global Requirements*. Lucía Clontz.
3. U.S Pharmacopeia. USP 36. Chapter <1117> *Microbiological Best Laboratory Practices*"
4. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist (AOAC) – 12th. Edition.
5. PDA Technical Report N° 1 – *Validation of Moist Heat Sterilization Processes* – Revised 2007 - Sterilization Process Development - Cycle Development - Liquid Load Development- Liquid Load Patterns".
6. *Validation of Steam Sterilization in Autoclaves* (De Santis and Rudo) - Loaded-chamber heat penetration studies – Load cool point.
7. DRAFT 13 (2002) - PDA – *Industrial Moist Heat Sterilization in Autoclaves* - Sterilization Cycles Development -Load Definition.
8. ISO 11133 - *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media* - Part 1: *General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*.

Capítulo I.4.

Cepario

Mónica Alejandra Prieto

Introducción

Definiciones

Proveedores de cepas de referencia

Manipulación de cepas de referencia

Métodos de preservación

- *Métodos de preservación a corto plazo*
  - *Subcultivos periódicos*
  - *Inmersión en aceite mineral*
  - *Congelamiento a −20 °C*
  - *Desecación*
- *Métodos de preservación a largo plazo*
  - *Ultracongelación*
  - *Liofilización*

Bibliografía

1. Introducción

La investigación y el desarrollo de métodos de preservación de microorganismos para su posterior estudio y/o utilización, comenzó a fines del siglo XIX, cuando la supervivencia de bacterias en hielo fue documentada por primera vez [1].

A partir del siglo XX, los microbiólogos desarrollaron distintos métodos de preservación de microorganismos [2], y de esta forma surgió el concepto de colecciones de cultivo, como herramienta valiosa para la investigación científica, el estudio de la biodiversidad, la investigación epidemiológica y la industria.

Los microorganismos han sido históricamente empleados en la producción de medicamentos, en la producción de alimentos y en la elaboración de reactivos, entre otras aplicaciones. También han sido implementados como agentes biorremediadores para la protección ambiental, y su utilización ha incrementado con el avance de la biotecnología [3]. Estas aplicaciones han fortalecido la necesidad de preservar y mantener los cultivos microbianos de manera tal que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables a lo largo del tiempo [4, 5].

Por otro lado, la continua expansión del mercado, con una acelerada proliferación de normas y ensayos analíticos, han requerido la implementación de sistemas de gestión de calidad en laboratorios de análisis microbiológicos para asegurar la trazabilidad de los resultados que se generan. Para demostrar la trazabilidad, los laboratorios deben utilizar cepas de referencia obtenidas directamente de una colección de cultivos microbianos nacional o

internacional reconocida, cuando éstas existan. Alternativamente, se pueden emplear derivados comerciales para los cuales el laboratorio ha demostrado la equivalencia de todas las propiedades relevantes en el punto de uso [6].

La Norma ISO 17025 contiene todos los requisitos que tienen que cumplir los laboratorios para demostrar que disponen de un sistema de gestión de calidad, que son técnicamente competentes y que son capaces de producir resultados técnicamente válidos. La acreditación de métodos de ensayo en microbiología requiere cepas de referencia [7].

2. Definiciones

Aislamiento: población de células microbianas recuperadas de una única colonia cuyas características fenotípicas y genotípicas no han sido definidas al nivel necesario para otorgarle la categoría de CEPA.

Cepa: población de células microbianas de origen conocido, con características fenotípicas y genotípicas definidas, identificado por lo menos al nivel de género y especie.

Cepa tipo: cepa que corresponde a la primera descripción y caracterización taxonómica de una nueva especie. Son establecidas por los subcomités internacionales de taxonomía

Cepa de referencia: Microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie, de origen conocido, depositados y mantenidos en una Colección de Cultivos (CC) o Centro de Recursos Biológicos (CRB), catalogados y descritos según sus características, que se utilizan para fines comparativos. Las cepas de referencia podrán ser subcultivadas una vez del cultivo original, para obtener cepas de reserva, realizando en paralelo los controles de pureza y ensayos bioquímicos que sean necesarios. Norma ISO 17025, apartado 5.6.3.[7].

Cepas de reserva o cultivos de reserva: Primer subcultivo o pasaje de una cepa de referencia suministrada por el proveedor o que procedan directamente del proveedor como tales.

Cepas de trabajo o cultivo de trabajo (cultivo de uso): Primer subcultivo obtenido de una cepa de reserva. Son los cultivos que se utilizan en la rutina diaria (por ejemplo: controles de calidad internos)

Cepas comerciales: cepas suministradas por casas comerciales diferentes de las CC o CRB, y que pueden o no proceder de una colección de cultivos.

Cepas salvajes: Aislamientos microbianos no comerciales que no pertenecen a una CC o BRC. No proceden de CC ni de BRC.

Ensayo de Homogeneidad o Control de calidad post preservación: Es el control de calidad de los lotes de cepas preservadas a fin de comprobar su homogeneidad. Incluye control de viabilidad, pureza e identidad y se realiza inmediatamente después de finalizado el procedimiento de preservación.

Ensayo de Estabilidad o Control de calidad durante el almacenamiento: Se realiza durante el almacenamiento de los cultivos preservados. Incluye control de viabilidad, pureza e identidad.

Ensayo de Identidad: Reconocimiento del género y la especie taxonómica del microorganismo mediante estudios morfológicos, bioquímicos, serológicos, proteómicos, moleculares u otros que permitan diferenciarlo de otros microorganismos.

Repique o subcultivo o pasaje: Transferencia de un inóculo de células de un medio de cultivo a otro medio fresco donde se registra desarrollo.

3. Proveedores de cepas de referencia

Existen tres tipos de proveedores de cepas de referencia. Las colecciones de Cultivo (CC), los Centros de Recursos Biológicos (CRB) y las casas comerciales**.**

Las diferentes CC nacionales e internacionales tienen políticas individuales respecto al depósito y suministro de microorganismos. En la actualidad, todas las CC internacionalmente reconocidas, miembros de la *World Federation for Culture Collections* (WFCC), han implementado Sistemas de Gestión de la Calidad, están certificadas para la norma ISO 9001:2000 y poseen documentos públicos que regulan las transferencias del material biológico.

La creciente demanda de muestras de calidad y datos asociados promueve un cambio de paradigma para que tanto las CC privadas o institucionales adopten el modelo de CRB, definido por la organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) como "una parte esencial de la infraestructura sobre la que descansan las Ciencias de la Vida, y muy particularmente la Biotecnología" [8]. Estos organismos deben cumplir los más altos estándares de calidad y experiencia para la distribución del material biológico que demanda la comunidad científica internacional y la industria [9]. Por material biológico se entiende: organismos vivos, células, genes y toda la información relativa. Actualmente la mayoría de las CC internacionalmente reconocidas están evolucionando al concepto de CRB.

Los proveedores comerciales son aquellas empresas certificadas por ISO 9001, que comercializan subcultivos de cepas de referencia adquiridas en una CC o CRB reconocida. Dichos proveedores deben informar el número de pasaje del cultivo comercializado.

4. Manipulación de las cepas de referencia

Las cepas de referencia deben ser reconstituidas siguiendo las instrucciones del proveedor. El proveedor debe entregar el material junto con la documentación que incluya número de pasaje, lote, protocolo para reconstituir el cultivo (en función del tipo de presentación), el medio de cultivo a emplear y las condiciones de incubación. A partir de las cepas de referencia suministradas por las CC o CRB, se obtienen las cepas de reserva (primer subcultivo), y de éstas se obtienen las cepas de trabajo (segundo subcultivo).

Los cultivos suministrados por el proveedor tienen que cumplir 3 requisitos:

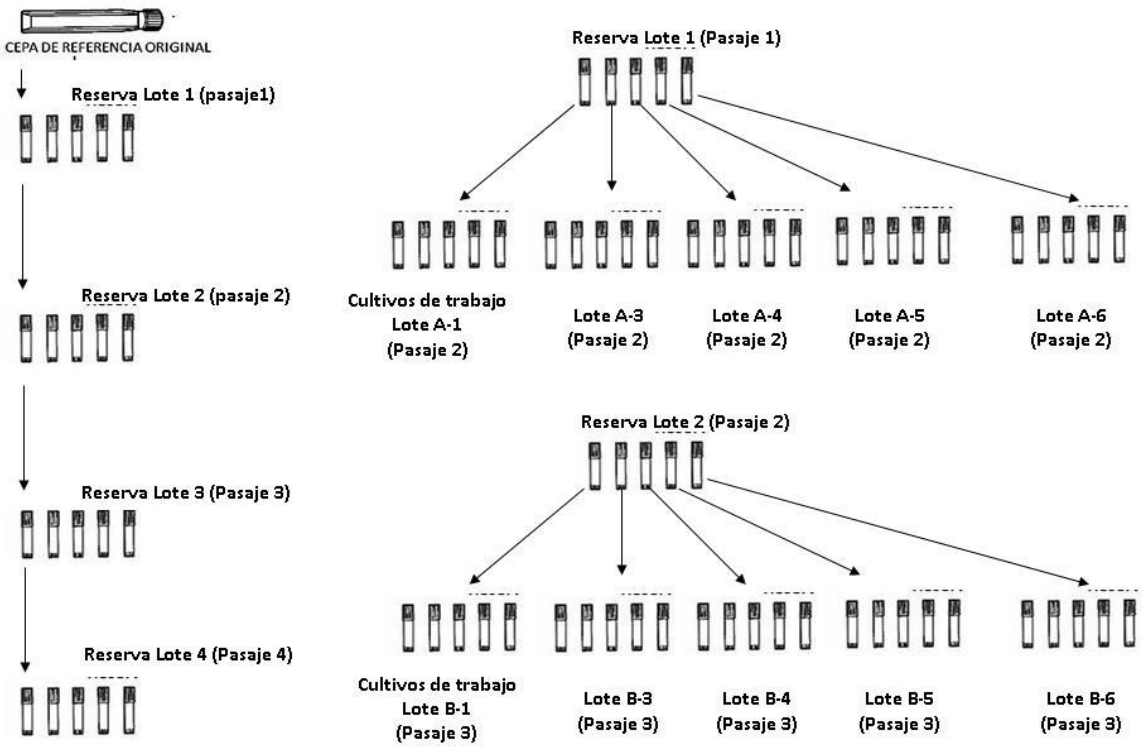
- Pureza: ausencia de contaminación.
- Autenticidad: género y especie determinados por métodos de referencia.
- Estabilidad: Mínimo número de pasajes o repiques.

El laboratorio receptor de la cepa de referencia debe realizar sólo un subcultivo para producir los cultivos de reserva. Se deben realizar chequeos de pureza y autenticidad en forma paralela según correspondan. Se recomienda almacenar los cultivos de reserva en alícuotas congeladas o liofilizadas. Los cultivos de trabajo para el uso rutinario deben ser subcultivos primarios de los cultivos de reserva para minimizar siempre el número de pasajes. Si los cultivos de reserva han sido descongelados, no deben volver a congelar ni reutilizar. El laboratorio debería planificar y organizar un cronograma de utilización de cultivos de trabajo para poder calcular el número de viales de cultivo de reserva que deberá producir al reconstituir y subcultivar la cepa de referencia. Generalmente, no pueden ser utilizados más de cinco repiques (o pasajes) de la cepa de referencia original en un método estándar. En aquellos casos que se utilicen cepas con más de 5 repiques, el laboratorio debería proveer pruebas documentales de que no ha habido cambio en ninguna propiedad relevante. En la figura 1 se muestra un esquema probable para el procesamiento y almacenamiento de cepas de referencia y sus respectivos lotes de reserva y de trabajo [10].

5. Métodos de preservación

Existen numerosos métodos descriptos para la preservación de microorganismos. La preservación y almacenamiento efectivos se definen como la capacidad de mantener un microorganismo viable, libre de contaminación y sin cambios en sus características fenotípicas y genotípicas. Así mismo el microorganismo debería ser fácilmente reconstituido a su condición previa al proceso de preservación. Los métodos óptimos para la preservación dependen del tipo de microorganismo. Los métodos se dividen en métodos de corto y largo plazo, de acuerdo a la capacidad de mantener la estabilidad y viabilidad de cada uno de ellos. Este capítulo está enfocado en la descripción de métodos de conservación para la preservación de bacterias.

Figura 1: *Protocolo de procesamiento de cepa de referencia. Esquema adaptado de Hay y col.* [10].



Igual procedimiento para obtener cultivos de trabajo (Pasaje 4 y 5) a partir de los lotes de reserva 3 y 4 respectivamente

5.1. Métodos de preservación a corto plazo

5.1.1. Subcultivos periódicos

El método más simple para mantener la viabilidad de los microorganismos durante un corto plazo es el subcultivo periódico a medios de cultivo frescos. Si los microorganismos desean preservarse por períodos mayores a una semana, este simple método se transforma en un método laborioso, que requiere amplios espacios de almacenaje y puede afectar la estabilidad de las cepas.

Cada subcultivo o pasaje aumenta la probabilidad de mutaciones que pueden expresarse en cambios fenotípicos no deseados. Si las características que interesan preservar están codificadas en plásmidos, este método no es recomendable dado que los microorganismos pueden perder los elementos genéticos móviles durante los subcultivos.

El intervalo entre subcultivos o pasajes, requeridos para mantener la viabilidad, varía de acuerdo al tipo de microorganismo. La frecuencia de mutaciones está asociada a las características del genoma y también dependerá del tipo de microorganismo [11]. Algunos organismos se mantienen estables indefinidamente mientras que otros muestran cambios fenotípicos luego de dos o tres pasajes. Por lo tanto, la elección de este método de preservación requiere conocer las características particulares del microorganismo, establecer el medio de cultivo adecuado, las condiciones de almacenamiento y la frecuencia de pasajes.

Los medios de cultivo recomendados son aquellos que permitan la supervivencia del microorganismo, pero minimicen los procesos metabólicos y disminuyan la velocidad de crecimiento. Un medio con muy pocos nutrientes puede representar un ambiente hostil para el microorganismo y puede estimular procesos de adaptación a través de mutaciones. Por el contrario, un medio de cultivo muy nutritivo permite una mayor velocidad de replicación y los pasajes necesarios para mantener la viabilidad deberán ser más frecuentes. Por lo tanto, no es posible

establecer un medio de cultivo y frecuencia de repique óptimos universales, ya que dependerán de la especie a preservar, e inclusive de las características particulares de una cepa individual. Los medios usualmente utilizados son: agua destilada estéril (*Pseudomonas* spp.), caldo o agar Tripticasa de Soya u otros caldos nutritivos. El buffer fosfato, PBS (composición: pH 7·2; KH_2PO_4, 15·44 μM; NaCl, 1·55 mM; Na_2HPO_4, 27·09 μM) ha demostrado ser un buen soporte de mantenimiento para varias especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, que mantienen su viabilidad asegurada hasta 30 semanas [12]. Esta metodología requiere cultivar el microorganismo en placas con medios sólidos nutritivos y condiciones óptimas de incubación hasta fase estacionaria temprana y luego suspender todo el desarrollo en tubos con 10 ml de PBS (2 o 3 tubos por cepa), que deben ser sellados herméticamente y almacenados en oscuridad a temperatura ambiente (20 ºC – 25 ºC).

Con respecto a las condiciones de almacenamiento, muchos laboratorios utilizan medios sólidos como agar Tripticasa de Soya en tubos en pico de flauta y los mantienen en las mesadas de trabajo a temperatura ambiente. Esta práctica provoca una rápida deshidratación de los medios de cultivo con la consecuente pérdida de viabilidad de los microorganismos. Se recomienda asegurar un cierre hermético de los tubos, como por ejemplo, utilizando tapa a rosca y sellado con parafina o *parafilm*. El almacenamiento deberá realizarse en un lugar alejado de la luz entre 5 °C y 8 °C, para disminuir los procesos metabólicos y asegurar la viabilidad por períodos más prolongados.

Cada laboratorio debe ensayar las condiciones y la frecuencia de pasajes para los microorganismos que desea preservar, de forma tal de identificar los intervalos adecuados de subcultivo y las mejores condiciones de almacenamiento. Es importante tener en cuenta, que cuando se realiza el subcultivo de una cepa, es conveniente seleccionar de 5 a 10 colonias para disminuir la probabilidad de propagar una población con características genotípicas o fenotípicas alteradas. En general, si no se trata de microorganismos fastidiosos, se sugiere una frecuencia de subcultivo de 2-3 semanas, si se mantienen refrigerados (4 ºC).

5.1.2. Inmersión en aceite mineral

Esta alternativa es sencilla y efectiva, principalmente para la preservación de hongos y bacterias aerobias esporuladas. Consiste en cubrir el cultivo con una capa de aceite mineral o vaselina. Este método puede mantener la viabilidad por períodos de hasta 3 años sin necesidad de subcultivos. Los microorganismos se mantienen metabólicamente activos, por lo tanto pueden ocurrir mutaciones, sin embargo la probabilidad es muy baja. El aceite mineral utilizado debe ser de grado medicinal y estéril para evitar contaminaciones. El aceite mineral no puede ser autoclavado y debe esterilizarse por calor seco a 170 °C por 1-2 horas. El cultivo debe preparase inoculando 5 a 10 colonias de la cepa a preservar, en tubo pico de flauta con medio de cultivo sólido o en tubo con 10 ml de caldo nutritivo. La incubación debe realizarse a temperatura óptima y una vez detectado el desarrollo, se añade en forma aséptica una capa de aceite mineral o vaselina estéril hasta cubrir el cultivo para evitar la deshidratación. Para bacterias anaerobias esporuladas, se utilizan tubos con una columna de aproximadamente 10 ml de agar nutritivo. Los tubos con agar deben fundirse a baño maría a 100ºC y mantener a esa temperatura por 15-20 minutos para lograr eliminación del oxígeno. Una vez fundido y desoxigenado, el tubo con agar se enfría a 50 ºC y se realiza la inoculación del cultivo. La siembra debe realizarse a partir de un cultivo en fase estacionaria temprana. Se recoge una anzada completa (si el medio es sólido) o se toman 100 µl (si el medio es líquido) y se depositan en el fondo del tubo con agar fundido a 50 ºC. El tubo con el cultivo se enfría rápidamente hasta solidificación del agar y se añade en forma aséptica una capa de aproximadamente 2 centímetros de aceite mineral estéril. Es importante evitar la introducción de burbujas de aire que puedan quedar atrapadas entre el medio y la capa de aceite. El tubo inoculado se incuba en aerobiosis por 24-48 horas hasta visualizar turbidez del agar en la parte inferior de la columna (desarrollo bacteriano en condiciones anaeróbicas) y luego se mantiene a temperatura ambiente. Si el laboratorio utiliza este método, deberá realizar pruebas de viabilidad para establecer la frecuencia óptima de subcultivos [13].

5.1.3. Congelamiento a −20 °C

Este método es utilizado por muchos laboratorios para preservar microorganismo por períodos mayores que el método de subcultivo periódico. Los cultivos de ciertas especies logran mantenerse viables hasta 1 año, pero en general, la viabilidad se pierde en un periodo de 30 días debido al daño celular causado por la formación de cristales de agua y las fluctuaciones de electrolitos. Es importante evitar la utilización de freezers con períodos automáticos de congelamiento-descongelamiento.

El medio de soporte más ampliamente utilizado es el Caldo Tripticasa de Soya y es conveniente la utilización de crioprotectores como el glicerol. La concentración final de glicerol recomendada es 10% V/V. También puede utilizarse leche descremada (*skim milk)* en concentración de 10% p/v. El cultivo debe preparase inoculando 5 a 10 colonias de la cepa en medio nutritivo sólido o caldo nutritivo, incubar en atmósfera y temperatura óptimas y una vez evidenciado el desarrollo microbiano, se realiza una suspensión con inóculo denso (mayor a 10^8 UFC/ ml) en viales con 1-2 ml de medio soporte. En la Tabla 1 se detallan períodos de almacenamiento a -20 ºC de algunos grupos bacterianos [14]. Los períodos de tiempo descriptos pueden variar entre distintas especies e inclusive entre cepas individuales. Cada laboratorio debería evaluar periódicamente, la viabilidad de sus cultivos preservados a -20 ºC para establecer un protocolo de preservación adecuado al tipo de microorganismo utilizado.

Tabla 1: *Condiciones de preservación por congelamiento a -20ºC de distintos grupos bacterianos*

Grupo	Medio soporte	Duración	Observaciones
Estreptococos	Leche descremada CTS +Gli 10%	2 meses	***S. pneumoniae*** y los estreptococos del grupo viridans, son de difícil mantenimiento. Se mantienen viables a -20ºC por 1 mes, suspendiendo cultivos frescos en leche descremada estéril
Bacterias aerobias esporuladas	CTS + Gli 10%	1-2 años	
Bacterias aerobias Gram positivas	CTS + Gli 10%	1-3 años	
Bacterias aerobias Gram negativas	*CTS + Gli 10%*	*1-2 años*	*Shigella spp, Vibrio spp. y complejo Burkholderia cepacia pierden muy rápidamente la viabilidad*
Micobacterias	Leche descremada	3-5 años	
Bacterias exigentes nutricionales o de lento desarrollo	CTS + Gli 10%	15-30 días	Ej. *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Actinobacillus* spp., grupo HACEK.
Bacterias anaerobias no esporuladas	No recomendado		

CTS: Caldo Tripticasa de Soya; Gli: glicerol

5.1.4. Desecación

Estos métodos se basan en detener el crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible en la célula en un soporte inerte y estéril. Los cultivos bacterianos se pueden colocar en soportes como papel filtro, piedra pómez (pumita), turba, bolitas de alginato e incluso sal gorda (para bacterias halófilas) [15].

Durante la desecación, las células sufren estrés por oxidación y pérdida de agua, razón por la cual el número de células viables disminuye notablemente, especialmente para microorganismos sensibles. La mayoría de los microorganismos no sobrevive la desecación por periodos mayores a unos pocos días, sin embargo algunas bacterias esporuladas pueden ser preservadas en discos de papel. El cultivo debe preparase inoculando 5 a 10 colonias en un caldo nutritivo hasta obtener una suspensión de 10^8 UFC/ ml, que es inoculada en discos de papel de filtro. Los discos son secados a temperatura ambiente o en cámara de vacío y distribuidos en viales. Estos

viales se incuban en lugar oscuro a 4 ºC o -20 ºC. Los microorganismos pueden mantenerse viables hasta 4 años[16]. Para reconstituir el cultivo se toma un vial con discos del refrigerador o freezer y se deja a temperatura ambiente por 15 minutos para estabilizar la temperatura. Luego, se retira un disco con pinza estéril y se coloca sobre una placa con medio nutritivo sólido o líquido adecuado para el microorganismo en cuestión. Se incuba a temperatura óptima y debe controlarse la pureza e identidad previamente a su utilización.

5.2. Métodos de preservación a largo plazo

Los métodos recomendados para preservar microorganismo por períodos mayores a dos años son la criopreservación o ultracongelación y la liofilización. Aunque la inversión inicial para adquirir el equipamiento (unidades eléctricas de ultra baja temperatura, tanques de nitrógeno líquido, liofilizadores) es significativa, esta metodología es menos laboriosa, más efectiva, requiere menos espacio para el almacenamiento y principalmente reduce significativamente la probabilidad de ocurrencia de mutaciones, aunque ha sido documentada la pérdida de elementos genéticos móviles durante el almacenamiento a -80 ºC [17,18].

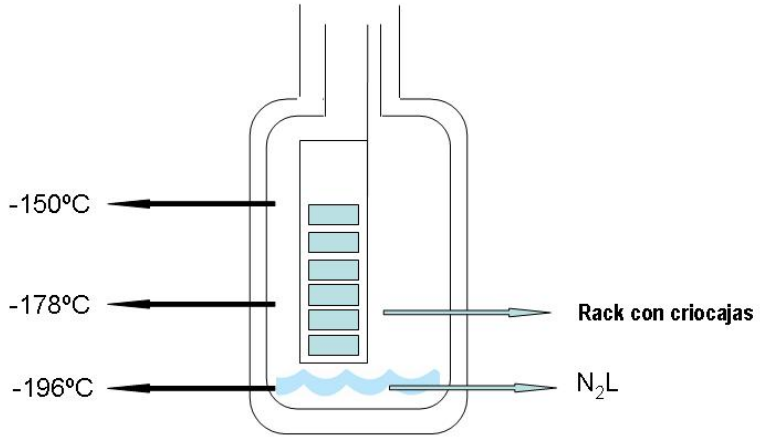
Durante la criopreservación y la liofilización, las células microbianas son expuestas a temperaturas de congelamiento que promueven la formación de cristales de hielo tanto en la suspensión como dentro de las células, provocando un desequilibrio osmótico que induce cambios bioquímicos y físicos, como por ejemplo, la ruptura de membranas celulares que lleva a muerte celular. Para proteger a los microorganismos del daño producido durante el proceso de congelamiento, liofilización y descongelamiento, se añaden a la suspensión del cultivo, agentes químicos denominados crioprotectores (criopreservación) o lioprotectores (liofilización).

Aunque los métodos de ultracongelación y liofilización han demostrado buenos resultados en términos de viabilidad y mantenimiento de la integridad genética, aún es necesario profundizar la optimización de protocolos, condiciones, y uso de otros agentes crioprotectores o lioprotectores con un grupo más diverso de microorganismos.

5.2.1. Ultracongelación

La ultracongelación es el método de elección para preservación de microorganismos por períodos prolongados. Los sistemas para alcanzar estas temperaturas son las unidades eléctricas de ultra baja temperatura, denominados *ultrafreezer* (-80 ºC) o las unidades de almacenamiento con nitrógeno líquido (-196 ºC a -150 ºC), denominadas tanques de nitrógeno líquido. Estas bajas temperaturas previenen la desnaturalización y el daño de las proteínas y del ADN celular. El movimiento del agua intracelular disminuye y de esta forma, el metabolismo celular es prácticamente detenido y así las células se mantienen viables por períodos prolongados de tiempo. La preservación a -80ºC es adecuada, pero −196 °C es considerada la temperatura ideal porque las probabilidades de mutaciones a esta temperatura son casi cero [19]. Durante la criopreservación en nitrógeno líquido los viales pueden almacenarse sumergidos en nitrógeno (−196 °C) o en su fase gaseosa (−150 ºC a −178 °C). El almacenamiento en fase gaseosa se considera mejor para evitar el ingreso de nitrógeno líquido al interior del criovial y de esta forma prevenir explosiones y contaminación viral. Figura 2.

Figura 2: *Temperaturas en sistemas de almacenamiento (tanques) de nitrógeno líquido (N_2L)*



Agentes crioprotectores

Existen dos clases de agentes crioprotectores: aquellos que no son penetrantes y aquellos que penetran la célula microbiana. Los crioprotectores penetrantes son los recomendados, éstos disminuyen el punto de congelación del agua, promueven la formación de puentes hidrógeno y la vitrificación de solventes y de esta forma se previene la formación de cristales de hielo en el interior de la célula. El crioprotector ideal es aquel que es altamente soluble en agua, penetra el interior de la célula, no es reactivo y no precipita a altas concentraciones.

Los agentes crioprotectores penetrantes más ampliamente utilizados son el glicerol (concentración 10-15% v/v) y el Dimetilsulfóxido (DMSO, concentración 5-10% v/v). El DMSO tiene mayor capacidad penetrante a bajas temperaturas, sin embargo, dada su toxicidad a altas concentraciones, generalmente se utiliza glicerol. Entre los crioprotectores no penetrantes, los más ampliamente utilizados son: leche descremada (*skim milk*), sacarosa, lactosa, glucosa, sorbitol y manitol [4].

Algunos investigadores han documentado que la leche descremada (concentración 10% p/v) es mejor crioprotector que el glicerol (15%) en caso de fallas eléctricas en los *ultrafreezer*, ya que mantuvo la viabilidad por períodos más prolongados después de períodos largos de descongelamiento. La leche descremada podría afectar la composición de ácidos grasos de la membrana celular, por lo tanto alteraría la fluidez de la membrana contribuyendo a la estabilidad de las enzimas celulares [20].

Preparación de crioprotectores

Glicerol: Preparar una solución al 20% v/v de glicerol en agua destilada. Autoclavar a 121 ºC por 15 minutos. Se puede almacenar a temperatura ambiente hasta 3 meses. Agregar a la suspensión microbiana para una concentración final del 10%.

DMSO: Preparar la solución y esterilizar por filtración. Puede ser almacenada a temperatura ambiente sólo por un mes. Agregar a la suspensión microbiana para una concentración final de 5%.

Leche descremada: Se utiliza polvo deshidratado para uso microbiológico. Preparar una solución al 20% p/v en agua destilada. Distribuir en tubos en cantidades de 10 ml y esterilizar en autoclave a 116 ºC durante 20 minutos, para evitar caramelización. Debe almacenarse a 4 ºC.

Viales para preservación a ultra bajas temperaturas

Los viales para criopreservación se denominan crioviales, deben ser aptos para tolerar ultra bajas temperaturas y mantenerse cerrados herméticamente. Generalmente se utilizan crioviales de polipropileno con tapa a rosca y anillo O para asegurar el cierre hermético (Figura 3). Estos viales son comercializados por varias empresas en distinto tamaños (1 ml, 2 ml). El tamaño dependerá del modelo de caja que se utilizará.

Figura 3: *Viales y caja de polipropileno para criopreservación*

Preparación del cultivo para criopreservar

La cepa se siembra en medio de cultivo adecuado para obtener máximo desarrollo, preferentemente sólido en placa de Petri. La incubación se lleva a cabo a temperatura y atmósfera de crecimiento óptimas hasta fase de desarrollo logarítmico tardío o fase estacionaria temprana. Se suspende el cultivo en el criovial que contiene Caldo Tripticasa de Soya más el crioprotector seleccionado o leche descremada al 10%. Si la cepa fue cultivada en medio líquido, una vez en fase estacionaria, se centrifuga el cultivo y se resuspende el pellet en caldo tripticasa de soya más el crioprotector seleccionado o en leche descremada al 10%. El volumen de alícuotas para ultracongelar es usualmente 0.5-1 ml. El inóculo inicial recomendado no debe ser menor a 10^7 UFC/ ml.

Cuando se agrega un agente crioprotector penetrante a la suspensión bacteriana, es conveniente dejar la mezcla a temperatura ambiente por 10-15 minutos antes de iniciar el proceso de congelamiento, ya que a esta temperatura el crioprotector puede penetrar más fácilmente la célula bacteriana. Sin embargo, es importante no dejar a temperatura ambiente por tiempos más prolongados, porque los agentes crioprotectores se tornan tóxicos para la célula.

Un punto crítico para asegurar máxima viabilidad de los cultivos ultracongelados es la velocidad de enfriamiento durante el proceso de criopreservación. En la Figura 4 se muestran los efectos fisiológicos de la velocidad de enfriamiento sobre la célula en proceso de criopreservación. ATCC (*American Type Culture Collection*) recomienda un enfriamiento controlado (−1 a −5 °C min^{-1}) del criovial hasta una temperatura de -30 ºC, seguido de un enfriamiento más rápido hasta llegar a la temperatura final de almacenamiento. Existen dispositivos comerciales para el congelamiento controlado (*controlled-rate freezer systems*). Es posible lograr un congelamiento controlado en forma manual mediante sistemas comerciales sencillos diseñados para conseguir una velocidad de refrigeración muy próxima a - 1 °C/ min, como el que se muestra en la Figura 5. También se puede realizar en forma artesanal, colocando los crioviales en cajas de poliestireno con material aislante dentro del *ultrafreezer* por un par de horas antes de almacenarlos directamente a la temperatura final.

Algunos investigadores han documentado alta recuperación de cultivos microbianos ultracongelados, utilizando altas y bajas velocidades de enfriamiento, mientras que con velocidades intermedias observaron disminución significativa de la viabilidad celular [21]. La respuesta de las células no sólo depende de la velocidad de enfriamiento, sino también del tamaño celular, la permeabilidad al agua y la presencia de pared celular [22].

Figura 4: *Efectos de la velocidad de enfriamiento durante el proceso de criopreservación*

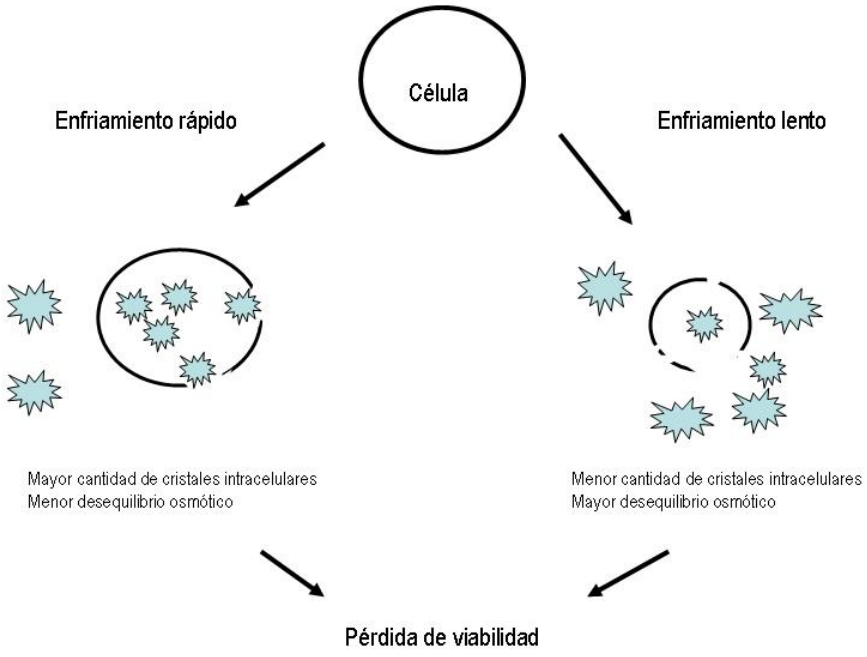


Figura 5: *Sistema manual de enfriamiento controlado*

Un método muy útil y eficaz para preservar microorganismos en ultrafrío es utilizar perlas de vidrio. Los crioviales contienen perlas de vidrio de aproximadamente 3mm y aproximadamente 200 µl de glicerol al 20% v/v donde se suspende el cultivo a preservar (Figura 6) Esta metodología se puede preparar *in house*, aunque existen presentaciones comerciales listas para el uso que constan de un criovial estéril con 25-30 perlas de vidrio tratadas con crioconservantes, a las cuales sólo debe añadirse 200 µl de una suspensión de cultivo fresco, mezclar y congelar. Para reconstituir el cultivo, solo es necesario remover una perla del criovial congelado e inocularla en medio de cultivo y de esta forma no es necesario el descongelamiento de todo el vial.

Figura 6: *Criovial con perlas de vidrio*

Recuperación de cultivos preservados a temperaturas ultra bajas

El proceso de descongelamiento provoca serios daños celulares. Las temperaturas críticas están en el rango de -40 ºC a -5 ºC. Algunos estudios sugieren que un calentamiento rápido durante ese rango de temperatura mejora la tasa de recuperación [14]. Al retirar el criovial del *ultrafreezer* o tanque de nitrógeno líquido, debería colocarse en un baño a 35 ºC hasta que todo el hielo haya desaparecido. Una vez descongelado, el cultivo debe transferirse inmediatamente a un medio de cultivo adecuado. Durante el proceso de descongelamiento los cambios rápidos de temperatura y los cambios de presión dentro de los viales pueden hacer que estos exploten. Por lo tanto, el personal debe utilizar vestimenta protectora y gafas durante este proceso. Para fines más prácticos en el laboratorio, los viales de la mayoría de las bacterias y levaduras pueden ser descongelados a temperatura ambiente y cultivarse con buenos porcentajes de recuperación para la mayoría de los microorganismos utilizados de rutina [14]. Si es necesario, se puede descongelar sólo el menisco superior de la suspensión, tomar una alícuota (20-50µl) para subcultivar y guardar el criovial nuevamente en el *ultrafreezer* sin que ocurran daños importantes. Sin embargo, esta práctica no se recomienda y se sugiere planificar con anterioridad, el número de crioviales producidos para descongelar completamente y descartar cuando se requiera el cultivo de la cepa.

5.2.2. Liofilización

La liofilización es el método preferido para la preservación a largo plazo, por su efectividad, pero también por el bajo costo de mantenimiento y por la facilidad para transportar especímenes biológicos liofilizados en condiciones poco exigentes. Es más eficaz que la ultracongelación, debido a que el riesgo de formación de cristales intracelulares que comprometen la viabilidad es mucho menor. Es un método óptimo para la preservación de muchas bacterias que se mantienen viables y pueden almacenarse por más de 30 años, excepto *Helicobacter pylori* y *Clostridium botulinum* que no toleran el proceso de liofilización y los géneros *Campylobacter, Vibrio*, *Aeromonas* y *Azotobacter*, que solo se mantienen viables por 8-15 años [23].

El proceso de liofilización reduce la actividad de agua mediante congelamiento y sublimación del hielo al disminuir la presión atmosférica sometiendo el producto congelado al vacío. Este proceso es cruento y el éxito depende de las condiciones en las que se ha realizado. Existe variado equipamiento, el más completo es costoso y requiere mantenimiento mecánico. La eleccion del mejor método de liofilización depende del producto y de lo que se va a hacer con él. Los fenómenos de transferencia de calor y masa durante el proceso de liofilización demandan que las siguientes condiciones sean respetadas: gran superficie expuesta y poca profundidad de producto. Existen dos clases de tecnología: liofilizadores de cámara y de erizo [23].

Liofilizadores de cámara (*stopering*)

Cuentan con una cámara que dispone de una o más bandejas dentro de las cuales existen sensores y circuitos de enfriamiento y calefactores. Tienen un dispositivo de cierre con bandeja flotante que permite el cierre de frascos o ampollas especiales en condiciones de vacío o atmósfera controlada. Disponen de un sistema de enfriamiento y bomba de vacío instrumentado. El total de las variables en juego puede ser modificada por programación según los requerimientos del proceso.

Liofilizadores de erizo

Están formados por un sistema de vacío, un condensador y un sistema de conección de ampollas. Disponen de un recipiente refrigerado con un líquido de bajo punto de congelación en el que se introducen las ampollas. Una vez conectada al sistema, el exterior de la ampolla queda expuesta a la temperatura ambiente y no se tiene control sobre la transferencia de calor.

Viales

Se utilizan viales de borosilicato. Para liofilización en cámara se utilizan ampollas dobles, una ampolla de vidrio exterior para proteger la ampolla que contiene el producto liofilizado. Se agrega silica gel en el fondo de la ampolla exterior y un tapón de algodón antes de insertar la ampolla con el producto liofilizado. También se pueden utilizar frascos . Para liofilización en erizo se utiliza ampolla de vidrio, no pueden ser utilizados frascos. Los frascos y/o ampollas deben ser esterilizadas en horno seco antes de ser utilizados.

Cerrado y almacenamiento del producto liofilizado

Cuando el producto ha sido sometido a un correcto proceso de liofilización y consecuentemente se ha reducido la actividad de agua, es en general muy higroscópico y sensible a la oxidación. El producto liofilizado queda expuesto a las condiciones que le aporte la atmósfera del recipiente (ampolla o frasco) que lo contiene y a la temperatura e iluminación que reciba el mismo. Las condiciones varían según el tipo de recipiente en el que se realice el proceso. Si el producto es liofilizado en frasco, el cierre se realiza por el sistema *alucap* y este es un punto sensible en el proceso, el cierre puede ser hecho al vacío o en atmósfera controlada. Cuando el producto se liofiliza en ampolla en liofilizador en erizo, el cierre se realiza por la fusión del vidrio del cuello de la ampolla. Se pueden cerrar las ampollas al vacío o con una atmósfera controlada de nitrógeno seco u otro gas inerte. De ser bien realizado, brinda un sellado perfecto y el producto está preservado en forma óptima del daño del oxígeno y la humedad.

El almacenamiento de los cultivos liofilizados a temperatura ambiente no asegura el mantenimiento de la viabilidad por períodos prolongados. Es conveniente almacenar los viales en oscuridad y a temperatura de refrigeración. La viabilidad es aceptable almacenando a 4 ºC, sin embargo las temperaturas óptimas de almacenamiento para asegurar la máxima supervivencia está dentro del rango -30 ºC a -60 ºC [14].

Medios soporte y preparación del cultivo

El medio soporte para liofilizar se compone de un agente criopreservante, también denominado lioprotector, que estabiliza las células cuando el agua es removida, y una matriz que permite que la muestra mantenga su forma luego del proceso de liofilización. Los disacáridos como sacarosa y trehalosa son excelentes lioprotectores, las

matrices más utilizadas son manitol, seroalbúmina bovina, suero y leche descremada. La leche descremada se utiliza más frecuentemente para liofilización en cámara mientras que para liofilización en erizo se prefiere un medio soporte más sacarosa como lioprotector.

La concentración de leche descremada utilizada es la misma que para la criopreservación. La sacarosa se prepara en solución en agua al 24% p/v y se mezcla en proporción 1:1 con la suspensión del microorganismo para obtener una concentración final del 12%.

El medio para liofilización recomendado y utilizado por ATCC tiene la siguiente composición para 100 ml: Caldo Tripticasa de Soya 0.75 gramos, Sacarosa 10 gramos, seroalbúmina bovina fracción V (SAB) 5 gramos. La SAB no tolera la esterilización por autoclave, por lo tanto la solución se prepara en forma individual y se esteriliza por filtración con membranas de 0.22 µm de tamaño de poro. El medio base se esteriliza en autoclave a 121 ºC durante 15 minutos, se deja enfriar y se añade en forma aséptica la solución estéril de SAB.

Es importante utilizar cultivos en fase estacionaria temprana y preparar la suspensión que será sometida al proceso de liofilización con un inóculo de 10^8-10^{10} UFC/ ml. El volumen por vial depende del tipo de frasco y/o ampolla, pero generalmente es 0.3 a 0.5 ml.

Reconstitución de cultivos liofilizados

Los viales deben abrirse con cuidado, utilizando elementos de protección personal y siguiendo las normas de bioseguridad, ya que los mismos están cerrados al vacío y al abrirse pueden generar dispersiones. La reconstitución del cultivo se realiza añadiendo un pequeño volumen (0.1 a 0.5 ml) de medio de cultivo, mezclando cuidadosamente hasta la disolución del polvo liofilizado para inmediatamente cultivar en medios de cultivos, atmósfera y temperatura adecuados según el microorganismo.

Conclusiones

La Tabla 2 intenta resumir la información desarrollada a lo largo del capítulo. Es importante enfatizar que tanto la criopreservación como la liofilización tienen ventajas y desventajas, y el comportamiento de las cepas preservadas varían entre las distintas especies. Aún cepas de la misma especie pueden responder en forma diferente al mismo proceso de preservación. El mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos preservados a lo largo del tiempo depende de ciertos factores críticos como la composición del medio soporte, de suspensión y de rehidratación (en el caso de liofilización), el tipo de crioprotector utilizado, la velocidad de congelamiento y descongelamiento, el estadío de desarrollo del cultivo, el tamaño celular, la composición de sus membranas, el contenido de agua y el tamaño del inóculo inicial.

Tabla 2: *Métodos de preservación para bacterias*

Método de preservación	Viabilidad durante almacenamiento	Observaciones
Subcultivos periódicos	1-2 meses	Microorganismos fastidiosos como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria* spp., y *Haemophilus* spp, sólo -70 ºC, N_2L o liofilización. Las cepas de referencia para controles de calidad pueden mantenerse a -20 ºC hasta 1 año o -70 ºC indefinidamente
Capa de aceite	1-2 años	
-20 ºC	1-3 años	
-70 ºC	1-10 años	
N_2	Hasta 30 años	
Liofilización	Hasta 30 años	Excepto *Helicobacter* spp, *C. botulinum, Campylobacter spp*

Tanto las CC, CRB o casas comerciales deberán entregar un instructivo sobre los métodos de preservación recomendados para cada cultivo de referencia provisto. Cuando el laboratorio desee preservar cepas salvajes, es necesario que conozca tanto las características fisiológicas del microorganismo como la propiedad biológica de interés a preservar, para seleccionar el método de preservación más eficaz. En estos casos, documentar los controles periódicos y divulgar los resultados, representarán una importante contribución al conocimiento en esta área de la microbiología.

Bibliografía

1. Prudden T. On bacteria in ice, and their relations to disease, with special reference to the ice-supply of New York City. Med Rec. 1887; 31: 341–78.
2. Swift HF. Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. J Exp Med. 1921; 33:69–75.
3. Pieper DH, Reineke W. Engineering bacteria for bioremediation. Curr Opin Biotechnol. 2000; 11: 262-70.
4. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiol Lett. 2013; 339: 1–9.
5. Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 94: 565.
6. ENAC 04:2002. Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos.
7. ISO/IEC17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
8. OECD (2001). Biological Resource Centres: Underpinning the future of life sciences and biotechnology. OECD Publications, Paris, France. pp 66.
9. OECD (2007). Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres (June 2007). [On-line]: http://www.oecd.org/document/36/0,3343,en_2649_34537_38777060_1_1_1_1,00.html.
10. Hay RJ. The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry. 1988; 171: 225-37.
11. Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(41):E2774-83.
12. Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. Letters in Applied Microbiology. 2003; 37: 45–50.
13. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. En: Bills G, Muller GM, Foster MS editors. Elsevier, Amsterdam, 2004, p 37-47.
14. She R, Petti C. Procedures for the Storage of Microorganisms. En: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D editors. *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*, Washington DC, ASM Press, 2015, p 161-168.
15. Morales YE, Duque E, Rodríguez O. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. Rev. Biotecnología Aplicada. 2010; 14 (2):11.
16. Kulkarni GA, Chitte RR. A Preservation of Thermophilic Bacterial Spores Using Filter Paper Disc Techniques. J Bioprocess Biotech. 2015; 5:223.
17. van Griethuysen A, van Loo I, van Belkum A, Vandenbroucke-Grauls C, Wannet W, van Keulen P, Kluytmans J. Loss of the mecA Gene 131 during Storage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. J Clin Microbiol. 2005; 43: 1361-65.

18. Riederer K, Iyer S, Shemes S, Dejaeghere V, Sharma M, Szpunar S, Khatib R. Effects of frozen storage on detection of intermediate vancomycin susceptibility and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates. J Clin Microbiol. 2015; 53:2392.

19. Smith D, Ryan M. Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. The Scientific World Journal. 2012. On line: https://doi.org/10.1100/2012/805659

20. Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, Hagman KE, Nickerson CA. Skim Milk Enhances the Preservation of Thawed -80°C Bacterial Stocks. J Microbiol Met.2008; 75: 135-38.

21. Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. Appl Environ Microbiol. 2004: 70: 268–72.

22. Cao-Hoang L, Dumont F, Marechal PA, Le-Thanh M, Gervais P. Rates of chilling to 0 degrees °C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 77: 1379–87.

23. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. J Gen Appl Microbiol. 2008; 54:9–24.

24. Peiren J, Buyse J, De Vos P, Lang E, Clermont D, Hamon S, Bégaud E, Bizet C, Pascual J. Ruvira MA, Macián MC, Arahal DR. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99: 3559-71.

Capítulo I.5.

Los hongos como contaminantes en la industria farmacéutica y cosmética

Lilia Cavaglieri, Carina Pereyra, Verónica Alonso, Sofía Chulze

Introducción

Distribución fúngica en el ambiente

Contaminación fúngica en productos farmacéuticos

Contaminación fúngica en productos cosméticos

Control de la contaminación fúngica

Evaluación de riesgos

Fuentes de contaminación en ambientes farmacéuticos

Estrategias para la identificación fenotípica de aislados fúngicos

Medios de cultivo

Incubación

Técnicas para la examinación microscópica

¿Qué debemos observar para identificar una colonia fúngica?

Identificación de los cultivos de hongos filamentosos a partir de las características micro y macromorfológicas

Levaduras

Características generales de las levaduras

Importancia y características de los géneros de levaduras relacionadas a la industria farmacéutica y cosmética.

Identificación de las levaduras

Bibliografía

Introducción

Los hongos (filamentosos y levaduriformes) son un grupo importante de microorganismos responsables de diversas enfermedades (micosis) especialmente en individuos inmunocomprometidos. Además de su importancia en micología médica, estos organismos están asociados con la contaminación de las superficies y el deterioro de productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios. La contaminación fúngica de los productos farmacéuticos puede causar no solo pérdidas económicas graves al fabricante, sino también graves problemas de salud para los consumidores (pacientes) [1,2].

Distribución fúngica en el ambiente

Los hongos provenientes del aire, el agua, el personal y las materias primas pueden contaminar las diferentes instalaciones donde se fabrican y prueban los productos farmacéuticos. Cualquier contaminación en un producto estéril constituye un riesgo inaceptable para la seguridad del paciente, mientras que la contaminación fúngica de productos no estériles constituye una de las razones principales de retiro de los productos, cierre de la producción y de pérdidas de mano de obra y fabricación.

La distribución fúngica en el aire es ampliamente variable, en términos de cantidad y calidad; varía de acuerdo al área geográfica, de la estación anual, de la temperatura, la humedad relativa, la velocidad y dirección del viento, de la presencia de actividad humana, etc.[3,4,5,6,7]. En los últimos años, se ha incrementado la importancia de los bioaerosoles en ambientes limpios debido a su relación con la salud humana. Se considera que la calidad del aire en los espacios cerrados es uno de los factores más importantes en la calidad de vida de los trabajadores de los laboratorios que pasan la mayor parte del tiempo en ellos. La contaminación del aire en las áreas de riesgo hospitalarias o en áreas limpias de las industrias farmacéutica, cosmética o alimenticia genera un problema potencial debido a la posibilidad que los contaminantes sean transportados y eventualmente depositados sobre las superficies, los materiales, los alimentos o las personas que se intentan proteger. Los microorganismos en el aire no sólo poseen una gran importancia biológica sino también económica.

Las esporas fúngicas son capaces de dispersarse vía aérea por lo que la exposición a éstos patógenos potenciales debe ser controlada y para ello es necesario determinar la composición y concentración de propágulos fúngicos aéreos en los ambientes limpios, clínicas y hospitales. Las áreas húmedas son un factor adicional que puede fomentar el crecimiento fúngico en ambientes limpios [8]. Este tipo de contaminación puede ser de naturaleza endógena, pero otras pueden ser adquiridas por vía exógena, a través de las manos de los profesionales de la salud, productos o biomateriales contaminados y de origen ambiental abiótico [9]. Se ha informado la exposición a biopartículas en edificios con humedad o aire acondicionado sin mantenimiento, como así también a enfermedades infecciosas y alérgicas manifestadas en profesionales de la salud y en personas inmunocomprometidas [10,11,12].

La importancia de los bioaerosoles se ha enfatizado en las últimas décadas debido a su estrecha relación con la salud humana, lo cual ha llevado a la aparición de enfermedades que van desde alergias a infecciones diseminadas en pacientes susceptibles [13]. Los hospitales constituyen ambientes que requieren cuidados importantes en términos de monitoreo ambiental de áreas críticas. El objetivo de estas medidas es identificar las posibles fuentes de contaminación y diseminación como así también el agente etiológico potencialmente involucrado. Por otro lado, en ambientes de clima controlado, la acumulación de humedad y materia orgánica en los aires acondicionados constituyen fuente poderosa de dispersión de bioaerosoles.

El monitoreo de bioaerosoles, de la micobiota de áreas adyacentes y de las manos de los profesionales de la salud pueden proveer información epidemiológica sobre los microorganismos implicados en las infecciones de hospitales o áreas de la salud. Diferentes estudios han demostrado la presencia de hongos en ambientes limpios de diferentes áreas de hospitales y laboratorios (Tabla 1). La presencia de especies fúngicas pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Candida*, *Alternaria*, entre otros, en ambientes limpios influirá sobre la contaminación fúngica tanto de los insumos como de los productos manufacturados farmacéuticos, cosméticos y médicos.

La candidiasis y las aspergilosis invasivas se han incrementado en los últimos años especialmente en pacientes inmunocomprometidos. *Candida albicans* es aún la principal especie aislada, aunque las especies no albicans se han incrementado en frecuencia y son a menudo refractarias a los tratamientos convencionales. Por otro lado, por la aparición de microorganismos resistentes han aumentado la mortalidad, los períodos de hospitalización y consecuentemente el aumento de los costos en los servicios hospitalarios [14].

***Tabla 1**. Monitoreo e identificación de hongos de procedencia biológica en los ambientes limpios.*

Área de estudio	Contaminación fúngica		País	Referencias
	Recuento (UFC/m^3)	**Aislamiento**		
UCIA y UCIP	1,7 x 10^4	*Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Thichoderma* sp., *Paecilomyces* sp., *Chaetomium* sp.	Brasil	Diniz y col. [9]
Centro quirúrgico	1,6 x 10^4			
Profesionales de la salud (uñas, espacios interdigitales, región orofaríngea)	-	*Candida albicans, C. parapsilopsis, C. guilliermondii, Trichosporum* sp.		
Picaporte	-	*C. guillermondii, C. lusitaniae, C. parapsilosis*		
Hospital 1	56 – 184	*Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Microsporum* sp., *Helminthosporium* sp., *Botryotichum* sp., *Achremonium* sp., *Pythium* sp., *Thrichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Clamidosporum* sp., *Mucor* sp., *Alternaria* sp., *Cryptococcus* sp.	México	Maldonado Vega y col. [29]
Hospital 2	32 – 442			
Laboratorio LAFYM	250 – 300	*Cladosporium* sp., *Penillium* sp., *Aspergillus* sp.	Guatemala	Herrera y col. [30]
Laboratorio LAMIR	360 – 400			
Laboratorio EMPAGUA	510 – 660			
Laboratorio AMSA	790 – 950			
Hospital	-	*Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.	Francia	Sautor y col. [31]
Hospital (área central, unidad de cuidados intensivos, sala de cirugía y laboratorio bioquímico)	-	*Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp.	Korea	Kim y col. [32]
Hospital	-	*Aspergillus* sp.	España	Ortiz y col. [33]
Áreas de atención medica	-	*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp.	Jordania	Qudiesar y col. [34]
Área limpia para desarrollo de vacunas	-	*Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Scopulariopsis* sp.	Brasil	Utescher y col. [35]

UCIA: Unidad de Cuidados Intensivos para Adultos, UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrico, LAFYM: Laboratorio de Análisis Fisicoquímica y Microbiología, LAMIR: Laboratorio de Microbiología de Referencia, EMPAGUA: Laboratorio de la Empresa Municipal del Agua, AMSA: Laboratorio de la Autoridad para el Manejo Sustentable del lago de Amatitlán.

Contaminación fúngica en los productos farmacéuticos

La contaminación microbiana de los productos farmacéuticos constituye una de las principales causas de los problemas de fabricación y del retiro de productos del mercado. El conocimiento de la distribución de microbiana de los ambientes farmacéuticos es fundamental en el control del proceso de los productos farmacéuticos estériles y no estériles. Los hongos son ubicuos en la naturaleza y por lo tanto plantean un riesgo para las operaciones de fabricación farmacéutica. *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Stachybotrys* spp. y otros hongos en muchos casos han causado problemas importantes de contaminación microbiana en ambientes de producción y de productos manufacturados. Estos hongos son detectados a través de monitoreos de los ambientes farmacéuticos utilizando técnicas y medios de cultivo apropiados, los cuales requieren de personal técnico especializado.

Dado que la contaminación fúngica en la industria farmacéutica es de naturaleza exógena y se encuentra relacionada con la contaminación ambiental, la Food and Drug Administration (FDA), USA ha puesto mayor atención al aislamiento ambiental y al análisis de los productos [15,16]. Vijayakumar y col.[17] han documentado que entre los años 1998 y 2009 se han retirado más de 140 productos por falta de garantías de esterilidad.

La mayoría de los retiros de productos de contaminación por hongos se deben a la contaminación por hongos, pertenecientes a especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* [17,18,19]. En comparación a las especies de micelio hialino, los hongos con micelio pigmentado son muy difíciles de tratar y son resistentes a los antimicóticos comunes. Por esta razón, es importante que el personal de la sala limpia conozca sobre la incidencia de los hongos de micelio dematiáceo y las medidas de control apropiadas. Esta tarea se hace más difícil porque no hay estudios importantes disponibles sobre los diferentes hongos de micelio dematiáceo y su incidencia dentro de salas limpias farmacéuticas y de ambientes controlados.

En las Tablas 2 y 3 se detallan diferentes productos farmacéuticos y cosméticos retirados en diferentes países en los cuales se ha observado algún tipo de contaminación fúngica.

Tabla 2. *Contaminación fúngica de productos de la industria farmacéutica.*

Producto farmacéutico	Aislado	Referencias
Gotas para ojos	*A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* spp., *Gliocladium* spp., *Acremonium* spp., *Alternaria* spp., *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra*	Feghhi y col. [16]
Gotas para ojos	*Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Mucor* sp., *Geotrichum* sp.	Fazeli y col. [15]
Inyecciones de metilprednisolona	*Exserophilum rostratum*	Smith y col. [36]
Suspension de ampicilina	Hongos filamentosos	Citado en Vijakumar y col. [17]
Suspensión de bicarbonato	Hongos filamentosos	
Fluoruro de sodio para la boca	Hongos filamentosos	
Suspensión oral	Levaduras	
Solución de electrolitos	*Aspergillus niger*	
Concentrado de dializado	Hongos filamentosos	
Sulfato de bario	Hongos filamentosos	
Jarabes	Levaduras, *Candida* spp.	
Allopurinol (tratamiento para la hiperuricemia y gota crónica)	*Rhizopus microsporus*	www.info.gov.hk/gia/general/200903/06/P200903060323.htm
Solución de limpieza de lentes de contactos	*Fusarium* spp.	Khor y col. [37]; Barry y col. [38]
Tinta negra para tatuaje	*Acremonium* sp.	FDA, 2002,2007 [39]
Tejido humano (Cryolife, Inc.)	Hongos filamentosos	
Enjuague bucal antiséptico	Hongos filamentosos y levaduras	

Tabla 3. *Contaminación fúngica en los productos utilizados como cosméticos.*

Producto cosmético	Aislamiento	Referencias
Lociones y aceites para bebés	Hongos filamentosos	FDA, 2002,2007 [39]
Loción humectante para la piel	*Aspergillus fumigatus, A. versicolor, Penicillium* sp.	
Crema para piel seca	Hongos filamentosos	Citado en Vijakumar y col. 2012 [17]
Spray de limpieza – loción astringente	Hongos filamentosos	
Loción con vitamina E	Hongos filamentosos	
Loción para cuerpo y manos	Hongos filamentosos	
Lociones y cremas	*Microsporum canis, A. fumigatus, Thichophyton* sp., *Penicillium* sp.	Hugbo y col. [40]
Máscaras, lápiz labial, delineador de ojos	*Candida albicans, Penicillium* sp., *A. fumigatus*	Muhammed H [41]

Contaminación fúngica en los productos cosméticos

La mayoría de los productos cosméticos requieren la adición de conservantes para evitar la contaminación microbiana y la rancidez, deben producirse en un entorno higiénico perfectamente limpio, por lo cual los equipos, instrumentos, tanques de almacenamiento y recipientes deben mantenerse con un nivel de limpieza alto.

La seguridad microbiológica es uno de los parámetros de calidad más dinámicos y críticos de los cosméticos. Hongos filamentosos y levaduras tales como *Penicillium* spp. *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* fueron encontrados en máscaras de pestañas, lápiz labial y delineador de ojos en diversos niveles de contaminación. La industria cosmética tiene muchas razones convincentes para establecer y mantener la calidad microbiológica de sus productos. Como estos productos rara vez se producen bajo condiciones estériles, es fundamental controlar adecuadamente los numerosos factores que intervienen en la microbiología de los productos. Estos factores incluyen: la calidad de la materia prima, higiene y capacitación del personal de fabricación, establecimiento de diseño y materiales sanitarios, aplicación del diseño y control del proceso de limpieza y sanitización validados, aplicación de factores químicos / físicos generales que incluyen calor, pH, adición de conservantes químicos y uso de envases de barrera apropiados. Todos estos factores son efectivos para el control de riesgos microbiológicos en los productos cosméticos.

Control de la contaminación fúngica

Una de las áreas más importantes en el control de los procesos farmacéuticos es el sistema de control del número, la sobrevivencia y la proliferación de los microorganismos durante la fabricación de los productos farmacéuticos estériles y no estériles. Para evitar la contaminación microbiana, las instalaciones de producción farmacéutica (medio ambiente), los materiales y el personal deben proporcionar un entorno que minimice la supervivencia, el crecimiento y la distribución de microorganismos.

Los hongos son ubicuos y, por lo tanto, suponen un riesgo para las operaciones de fabricación de los productos farmacéuticos. *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Trychophyton* spp. y otras especies de hongos filamentosos han causado, en algunos casos, importantes problemas de contaminación microbiana en entornos de producción y productos manufacturados. Dichos patrones de contaminación son detectados por regímenes de monitoreo ambiental efectivos usando una gama de técnicas de monitoreo de aire y superficie y medios de cultivo microbiológicos apropiados.

Dentro de salas limpias y ambientes controlados, las áreas de riesgo donde puede ocurrir contaminación con hongos incluyen:

- *Placas de retroceso de puertas*
- *Bolsas*
- *Incubadoras*
- *Cajas*
- *Ruedas de carrito*
- *Plafones*
- *Suelos con deficiencia en la limpieza*
- *Vibraciones de la construcción*
- *Luminarias*
- *Sistemas de aire acondicionado defectuosos*

Las especies más comúnmente aisladas de salas limpias son *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Pencillium* spp. y *Aurebasidium* spp. Además, el grado de aporte de hongos por parte del personal parece ser más importante de lo que se pensaba.

Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de América secuenciaron el ADN de hongos a partir de la piel de adultos sanos y encontraron que el talón y los dedos del pie presentaban niveles altos de hongos, como también otras partes del cuerpo relacionadas con la cabeza, el cuello y las cejas. Las principales especies encontradas en el cuerpo humano fueron *Malassezia* spp., *Pencillium* spp. y *Aspergillus* spp. [20]. Tales números altos significan que los procedimientos de vestimenta para las salas limpias y las disciplinas de comportamiento en las salas blancas deben ser de mayor cuidado.

En cuanto a la proliferación de hongos dentro de las salas limpias, los principales factores de riesgo son las áreas con poca ventilación o las salas blancas con cambios de aire insuficientes; donde las áreas están húmedas; y donde hay crestas o grietas en los acabados. Además, el yeso y la pintura pueden proporcionar una fuente nutricional para los hongos, aunque la adición de un fungistático en la pintura puede ser eficaz para inhibir el crecimiento de hongos.

Los materiales transferidos a las salas limpias también presentan un riesgo, particularmente las materias primas en las que la micobiota está asociada con materiales de origen vegetal como la goma arábiga, el tragacanto, el agar y los almidones. Los materiales de embalaje también pueden ser una fuente de contaminación. Los factores primarios de riesgo son polvo, cartón y transporte.

A los peligros mencionados precedentemente se pueden agregar “factores de influencia”, que pueden afectar la probabilidad que los hongos sobrevivan. Estos factores incluyen cambios en las condiciones ambientales (como un aumento de la temperatura ambiente, humedad del aire); comportamiento e higiene del personal; eficacia biocida; limpieza ineficaz; la época del año; y el entorno geográfico.

Uno de los problemas en el seguimiento de la contaminación a través de una instalación farmacéutica es la falta de identificación de especies fúngicas. Para desarrollar la acción correctiva efectiva cuando se obtienen resultados fuera de especificación, se necesita una identificación fúngica precisa si se debe determinar y rastrear la fuente de contaminación. Una acción correctiva no es efectiva si se usa información incorrecta para desarrollar una solución adecuada a un problema determinado. Además, es de interés que muchas de las principales especies recuperadas de las salas blancas y los materiales son las mismas que las especies de hongos asociadas con los productos farmacéuticos que se retiran del mercado.

Evaluación de riesgos

Con productos no estériles, cuando se detecta contaminación fúngica como resultado de las pruebas del producto final, se requiere una evaluación para determinar si el hongo es objetable. Según Sutton [21], este análisis de riesgos debe incorporar un mínimo de cuatro consideraciones separadas. Estos son números absolutos de organismos observados, las características del microorganismo; características del producto; y el impacto potencial en los pacientes.

Un énfasis mayor en la evaluación de los riesgos y una comprensión más completa de las herramientas y los métodos, junto con un mejor entendimiento de la naturaleza de la contaminación fúngica ayudará a minimizar el número de productos no estériles que están en mayor riesgo de contaminación.

Fuentes de contaminación en los ambientes farmacéuticos

La contaminación fúngica en los ambientes de procesamientos farmacéuticos se origina a partir del aire, agua, del personal y de los materiales introducidos a través de los diferentes equipos donde los productos son manufacturados y evaluados. Para determinar el grado de la contaminación se utilizan métodos estándares de identificación, sin embargo, con el desarrollo de mejores métodos de análisis se puede obtener información tanto de la cantidad como de la distribución y actividad de los microorganismos contaminantes.

- Micobiota de la piel y el tracto respiratorio

Transferencia microbiana por los operadores: Los microorganismos pueden ser transferidos a las preparaciones farmacéuticas desde el operador que dirige el proceso de producción. Esta situación se considera "indeseable" para el caso de productos como tabletas o polvos y puede ocasionar el deterioro de las soluciones o suspensiones, pero en el caso de productos parenterales estériles esto causará graves consecuencias para el paciente por lo que este punto debe ser mucho más controlado dentro del procese productivo. Es importante considerar el nivel de protección como el uso de máscaras, guantes, trajes limpios, como así también gabinetes de flujo de aire unidireccional de diferentes niveles de seguridad según la necesidad específica.
En cuanto a los contaminantes en piel, en las zonas más serosas se encuentran frecuentemente levaduras lipofílicas, *Pityrosporum ovale* en cuero cabelludo; varios hongos dermatofitos pueden también estar presentes, e incluyen especies de los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum,* y *Trichophyton*.

- Materias primas

Las materias primas son responsables de una alta proporción de microorganismos introducidos durante la elaboración de los productos farmacéuticos. La selección de materiales de buena calidad microbiológica ayuda a controlar los niveles de contaminación tanto de los productos como del ambiente. La micobiota de las materias primas de origen vegetal tales como la goma acacia, tragacanto y los almidones puede provenir de la biota nativa de tales plantas y puede incluir hongos de las especies *Cladosporium*, *Alternaria* y *Fusarium* además de levaduras.

- Empaquetamiento

Los materiales de empaquetamiento tienen una doble función y actúan ya sea para contener al producto farmacéutico como así también para prevenir la entrada de los microorganismos o de humedad, que generen deterioro.
La micobiota del material de envasado va a depender de su composición y de las condiciones de almacenamiento. Además, el tipo de producto a ser envasado determinará si será requerido el tratamiento de esterilización. Los recipientes de vidrio son estériles al salir del proceso de esterilización, pero si son almacenados en lugares con polvillo y embalados en cajas de cartón para su transporte, puede ocurrir contaminación con esporas de las especies *Penicillium* y *Aspergillus*.
Los materiales de embalaje que poseen superficie lisa, impermeable libre de grietas e intersticios, tales como celulosa, acetato, polietileno, polivinilcloruro, laminados; tienen superficies con recuentos bajos de microorganismos. El cartón y el papel, a menos que hayan sido tratados transportan esporas de especies de *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. El riesgo aumenta cuando el cartón se humedece por lo cual se destaca la importancia de evitar el ingreso de cartón a las salas limpias.

- Edificios

Paredes y techos: Los hongos comúnmente se encuentran en las paredes y techos y las especies aisladas con mayor frecuencia incluyen Cladosporium *sp*., *Aspergillus sp*. (particularmente *A. niger* y *A. flavus*), *Penicillium sp*. y *Aureobasidium sp*. Dichas especies fúngicas son comunes en ambientes pobremente ventilados con paredes pintadas. Ellos obtienen la mayor parte de sus nutrientes del yeso sobre el que se ha aplicado la pintura; los acabados brillantes y densos son más resistentes que acabados suaves y mate. La adición de hasta un 1% de fungistático como el pentaclorofenol, 8-hidroxiquinolona, o-salicilanilina, constituye una ventaja. Para reducir el

crecimiento microbiano las superficies de las paredes y techos deberán ser lisas, sin grietas, sin material desprendible, y dicho requerimiento puede ser cumplido con un revestimiento plástico laminado.

- Equipamiento

Si se utilizan filtros o bolsas confeccionadas con materiales como lona, muselina o papel, debe asegurarse su limpieza y esterilización con regularidad para evitar el crecimiento de las especies de *Cladosporium sp*., *Stachybotrys sp*. y *Aureobasidium pullulans*, los cuales pueden utilizar la celulosa.

Estrategias para la identificación fenotípica de las especies fúngicas

Cuando se determina contaminación microbiana a partir del ambiente de un laboratorio a partir del equipamiento, excipientes, materia prima, aire, agua, o productos terminados; debe ser identificada la contaminación al menos a nivel de género. La identificación del microorganismo contaminante provee información sobre la posible fuente de contaminación. En el caso de la contaminación de origen bacteriano la identificación se realiza usualmente mediante sistemas bioquímicos tales como API o Vitek. En algunos casos para alcanzar los estándares de las normas ISO, algunas empresas realizan identificación genotípica. Estos métodos son relativamente sencillos para la mayoría de las bacterias aisladas en salas limpias, sin embargo para la identificación de hongos filamentosos se pueden utilizar técnicas de identificación molecular secuenciamiento de regiones ITS, métodos más complejos que aquellos basados en marcadores morfológicos a través del cultivo y la observación microscópica. Estas son técnicas mucho más sencillas y menos costosas con las cuales se pueden identificar los principales géneros fúngicos involucrados en este tipo de contaminaciones.

Medios de cultivo

Las diferentes metodologías de siembra para el aislamiento de las colonias fúngicas que se utilizan en productos de la industria farmacéutica y cosmética están descriptas en las principales farmacopeas (1, 2, 3, 4), tanto para productos estériles como para los no obligatoriamente estériles. Los medios de cultivo mayormente utilizados en el laboratorio para este fin se describen en la Tabla 4. Uno de los principales medios de cultivos utilizados es el agar Sabouraud con antibióticos para suprimir el crecimiento de bacterias en muestras altamente contaminadas, sin embargo, para muestras levemente contaminadas como suele ocurrir en la industria farmacéutica no es necesaria tanta selectividad.

Agar Sabouraud glucosa, agar papa dextrosa, y agar digerido de caseína-soja (equivalente al agar tripticasa soya) son los medios de cultivo más utilizados para el monitoreo ambiental de instalaciones de “salas limpias” (1,2,3,4).

Los medios agar extracto de malta y agar Czapek extracto de levadura son los medios de referencia para lograr una correcta identificación de los hongos filamentosos. En toda la bibliografía de referencia la observación micro y macroscópica de las especies y sus características distintivas están descriptas principalmente sobre estos medios de cultivo. Es importante resaltar que la morfología fúngica varia ampliamente de acuerdo al medio de cultivo utilizado.

Incubación

Los tiempos de incubación para los hongos filamentosos y levaduras varían entre 5 y 7 días a 20-25 ºC. En el caso de los ensayos de esterilidad el agar o caldo digerido de caseína-soja debe incubarse a 20-25 ºC durante 14 días.

La combinación del medio de cultivo, con la temperatura y el tiempo de incubación resulta determinante para la expresión de las características fenotípicas de los hongos, por lo cual si se busca lograr la identificación resulta indispensable seguir las metodologías estandarizadas planteadas en las claves taxonómicas utilizadas para la identificación.

***Tabla 4**. Medios de aislamiento fúngico listados en diversas farmacopeas.*

Medio	Fuente	Propósito	Principio electivo o selectivo
Agar Sabouraud-Glucosa con antibióticos	FA*,FE*, FJ*, FEU*	Selección de hongos, supresión de bacterias.	Alta concentración de carbohidratos, bajo pH, inhibidor de bacterias
Agar Papa-Dextrosa	FA, FJ, FEU	Selección de hongos, supresión de bacterias	El extracto de papa y la alta concentración de carbohidratos favorecen la esporulación.
Caldo Digerido de Caseína-Soja	FA, FE, FJ, FEU	Medio Universal	Ninguno
Agar harina de maíz o agar V8		Selección de hongos, supresión de bacterias	Medios con alto contenido de celulosa recomendados para el aislamiento de *Stachybotrys chartarum*
MEA	Piit y Hocking 2009.	Medio de referencia para el aislamiento y la identificación de especies fúngicas	Inducen la esporulación, inhibe el crecimiento bacteriano debido al bajo pH (pH de 3 a 5)
CYA		Medio de referencia para el aislamiento y la identificación de especies fúngicas	La sacarosa, el extracto de levadura y el nitrato de sodio favorece el crecimiento.

* FA: Farmacopea Argentina, FE: Farmacopea Europea, FJ: Farmacopea Japonesa, FEU: Farmacopea de Estados Unidos

Técnicas para la examinación microscópica

Como se mencionó anteriormente, cuando los microorganismos son aislados es necesario un subcultivo en los medios de cultivo en los cuales están basadas las descripciones morfológicas. En estos medios de cultivo la examinación visual de la colonia revela rápidamente importantes datos relacionados al color, textura, difusión de pigmentos, exudados, zonas y diámetro de crecimiento, estructuras macroscópicas como esclerocios, picnidios, esporodoquios, entre otros.

La examinación microscópica de los hongos se realiza normalmente sin tinciones, aunque puede utilizarse si fuera necesario la tinción con azul de algodón al lactofenol. Este colorante es el más utilizado en el área de la micología y consta de tres componentes principales el fenol que elimina cualquier organismo vivo y desactiva las enzimas líticas de las células evitando que las mismas se lisen, el ácido láctico preserva las estructuras fúngicas y el azul de algodón (fenol 20 mL, ácido láctico 20 mL, glicerol 40 mL, azul de algodón 0.05 mL, agua destilada 20 mL).

La técnica más adecuada utilizada para la examinación microscópica es el montaje de una porción de la colonia fúngica entre un portaobjetos y un cubreobjetos que luego se observa al microscopio óptico. Sin embargo, por más sencillo que parezca la destreza del operador a la hora de montar preparados resulta indispensable y muchas horas “preparar y mirar” son necesarias hasta lograr cierta habilidad para encontrar las estructuras características (y diferenciarlas).

En simples pasos esta técnica consiste en:

- Colocar una gota de solución fisiológica (o colorante de azul de algodón) sobre un portaobjetos.
- Realizar un corte de la colonia fúngica con ansa estéril, (preferentemente desde una placa de MEA o CYA incubada a 25 ºC) de manera perpendicular al agar y tomando una parte de este. No se arrastra parte de la colonia como en el caso de bacterias si no que se corta una fina lámina (Figura 1).
- Colocar el material sobre la gota de colorante o solución fisiológica y cubrir con el cubreobjetos presionando suavemente para lograr aplanar y diseminar el material, pero sin romper estructuras.

- Examinar al microscopio inicialmente en aumento de 5X e ir incrementando el aumento cuando fueron localizadas las estructuras de interés.

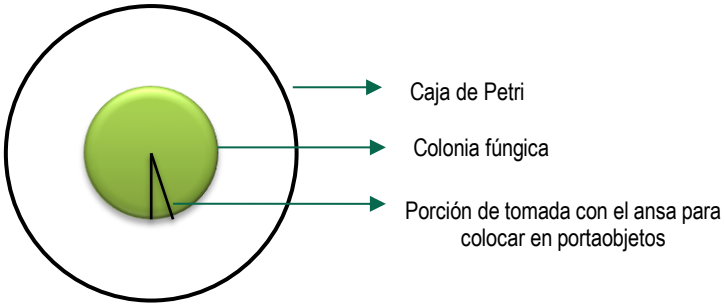


***Figura 1**. Esquema de corte de la colonia para obtener una lámina fina.*

Existe otra técnica de utilidad para la observación microscópica de las estructuras, es la técnica de la cinta adhesiva. Al igual que con la otra técnica el inconveniente suele ser "cargar" en el preparado solo esporas, lo cual no permite la identificación de los aislados. Esta técnica al ser menos invasiva permite mantener más fácilmente la integridad de las estructuras fúngicas, los pasos serían los siguientes:

- Cortar una porción manipulable de cinta adhesiva transparente
- Sostener ambos extremos entre el pulgar y con la superficie adherente hacia afuera
- Presionar el lado adhesivo de la cinta sobre la colonia y luego despegarlo,
- Colocar la cinta sobre una gota de solución fisiológica o colorante previamente colocado sobre un portaobjetos.
- Observar al microscopio

¿Qué debemos observar para identificar una colonia fúngica?

La Tabla 5 muestra las características macroscópicas y microscópicas que permiten describir una colonia fúngica.

***Tabla 5**. Pautas para la descripción macroscópica y microscópica de un hongo [22]. (Con modificaciones)*

Características macroscópicas	Color	Colonia Reverso Pigmento
	Tamaño de la colonia	Diámetro
	Apariencia	Correosa Aterciopelada Algodonosa Pulverulenta Granulosa
Descripción microscópica	Micelio	Hialino o dematiáceo Septado o aseptado (escasamente septado) Ancho o fino
	Pared del conidio	Delgada o gruesa Lisa o rugosa

Terminología:

Antes de comenzar con la identificación fúngica es conveniente familiarizarse con la terminología utilizada y reconocer las estructuras principales. Por lo cual cabe mencionar algunas definiciones básicas, que resultan indispensables para reconocer para la identificación de aislados fúngicos, y que pueden estudiarse junto a las imágenes que se presentan al final del capítulo.

- Esporangióforo: hifa especializada que sostiene uno o más esporangios
- Esporangio: célula asexual multinucleada como un saco o bolsa que divide todo su contenido en la formación de esporangiosporas.
- Esporangiosporas: propágulos asexuales de los hongos inferiores.
- Columela: expansión celular en forma redondeada u ovoide en la punta del esporangióforo sobre la cual se ubica el esporangio
- Fiálides: célula conidiogénica que da origen a los conidios sucesivamente de forma basípeta y desde un sitio fijo
- Métulas: célula de soporte sobre la cual pueden ubicarse las fiálides.
- Conidióforo: hifa que lleva los conidios
- Conidio: espora asexual
- Vesícula: célula hinchada que está en la parte final de la hifa que forma el conidióforo sobre la cual se ubican las fiálides o las métulas.
- Uniseriado: conidióforo formado solo por fiálides sobre la vesícula
- Biseriado: conidióforo formado por métulas y fiálides sobre la vesícula.
- Esclerocios: estructura de resistencia para soportar condiciones desfavorables.

Identificación de los aislados fúngicos a partir de marcadores morfológicos: características micro y macroscópicas

En la Tabla 6 se muestra un resumen de algunas de las características más importantes de las principales especies fúngicas aisladas en las salas limpias.

Tabla 6. *Características ecofisiológicas y morfológicas macro y microscópicas de los principales contaminantes fúngicos en las industrias farmacéutica y cosmética.*

Género	Fisiología	Características generales		Características morfológicas (sobre CYA y MEA 25 ºC)	
		Ecología	Producción de micotoxinas	Macroscópicas	Microscópicas
Rhizopus sp. (Figura 2)	Hongos de crecimiento rápido. Este género posee algunas especies patógenas para humanos que pueden crecer a temperaturas de 37ºC o superior.	Frecuentemente aislado de suelo y productos agrícolas. Causan deterioro en una gran variedad de frutas	Existen evidencias de actividad tóxica por parte de diversas especies dentro del género, aunque la identidad de los compuestos involucrados no ha sido aún elucidados.	Crecimiento rápido, que desborda la placa. Textura típicamente de algodón, el color de la colonia es inicialmente blanco y luego vira a marrón, esporangios negros.	Hifas no septadas, anchas 6-15 µm de diámetro, esporangióforos marrones normalmente sin ramificar, solos o en clusters, se observan rizoides; los esporangios entre 40-350 µm en diámetro, redondos con bases aplanadas columela en forma de paraguas, esporangiosporas estriadas redondas u ovoides de 4-11 µm.
Mucor sp. (Figura 3)	Hongos de crecimiento rápido. Algunas especies son capaces de crecer a más de 37 ºC	*Mucor spp* es un género muy común y extendido en la naturaleza, que se encuentra en los suelos, la vegetación en descomposición, el estiércol y muchos otros hábitats húmedos donde los hongos de crecimiento rápido tienen una ventaja .Algunas especies han sido reportadas como patógenos animales y humanos	La producción de micotoxinas no ha sido reportada.	Colonias que se extienden en toda la placa, con colores que varían según las especies entre gris, amarillento o amarronado. Los reversos normalmente son incoloros al igual que el micelio.	No se observan rizoides, Columelas que nace completamente de la pared de los esporangios, colapsan irregularmente, esporangiosporas lisas >5 µm, pueden presentar clamidoconidios,
Aspergillus sp.	Hongos de crecimiento lento	*Aspergillus* spp abunda en el medioambiente en todo el mundo, se desarrolla en una variedad de sustratos como maíz, material vegetal en descomposición y suelo. Además es también un contaminante común en aire.			
A. flavus (Figura 9)	Temperaturas mínimas de crecimiento entre 10-12 ºC y máximas entre 43-48 ºC y un crecimiento óptimo a 33 ºC aprox. Las a_w son muy variables desde 0.78 a 33 ºC a 0.84 a 25 ºC. La altas temperaturas disminuyen notablemente la conidiación	*A. flavus* es la especie más aislada en los alimentos, es muy ubicua. Es especialmente abundante en los trópicos, y tiene una afinidad particular por los frutos secos y las semillas oleaginosas	*A. flavus* es el mayor productor de aflatoxinas, la más peligrosa de todas las micotoxinas conocidas hasta el momento. Es capaz de producir los cuatro tipos de aflatoxinas que se encuentran en la naturaleza B1, B2, G1 y G2. Algunas cepas también son capaces de producir ácido cilcopiazónico	Colonias granulosas planas, a menudo con surcos radiales, amarillentas al principio pero rápidamente se vuelven amarillo verdoso oscuro.	Las cabezas conidiales son típicamente radiadas, mayormente entre 300 y 400 µm de diámetro, biseriadas aunque en algunos casos las fiálides nacen directamente desde la vesícula. Conidios globosos a subglobosos, verde pálidos y cubiertos de delicadas espinas. Algunas cepas producen esclerocios.

Tabla 6.(Continuación) *Características ecofisiológicas y morfológicas macro y microscópicas de los principales contaminantes fúngicos en las industrias farmacéutica y cosmética.*

Género	Fisiología	Características generales		Características morfológicas (sobre CYA y MEA 25 ºC)	
		Ecología	Producción de micotoxinas	Macroscópicas	Microscópicas
A. fumigatus (Figura 11)	Presenta un crecimiento rápido en 3 días, Es una especie termo tolerante tiene la habilidad de crecer a más de 55 ºC	Ubicuo en la naturaleza, produce aspergilosis pulmonar invasiva, aspergilosis alérgica principalmente en personas con deficiencias inmunológicas.	Produce gliotoxina, verruculogen, fumitremorgen, fumiclavinas y fumagilina.	La superficie es aterciopelada o polvorienta, varios tonos de verde con un borde blanco estrecho que se vuelve gris oscuro con la edad. Reverso blanco o color canela.	Hifas septadas Conidióforo liso y relativamente corto. Las fiálides son uniseriadas, compactas, con una formación columnar. Conidios lisos, redondos y pequeños (2-3.5 µ de diámetro)
A. niger (Figura 10)	Presenta temperaturas de crecimiento mínimas de 6-8 ºC, máximas de 45-47 ºC y óptimas de 35-37 ºC. Las esporas negras brindan protección contra la luz solar y la luz ultravioleta, proporcionando una ventaja competitiva en ciertos hábitats	*A. niger* prevalece en climas cálidos, tanto a campo como en almacenamiento. Es uno de los hongos más aislados en alimentos, es frecuentemente aislado en productos secados al sol.	Algunas cepas de *A. niger* son capaces de producir ocratoxina A bajo variadas condiciones.	Colonias en CYA de 60 mm de diámetro, usualmente cubren toda la placa, planas, velutinosas, micelio blanco coronado por una capa de cabezas conidiales de color marrón oscuro a negro reverso usualmente amarillo pálido.	Conidióforos, de 1-3 mm de largo, con paredes gruesas, hialinas y lisas; vesículas esféricas, generalmente de 50-75 mm de diámetro, radiadas, con métulas y fiálides estrechamente dispuestas en toda la superficie; conidios esféricos, 4-5 mm de diámetro, marrones, con paredes ostensiblemente ásperas o a veces estriadas.
A. terreus (Figura 12)	Los datos de crecimiento informados indican que *A. terreus* es termófilo, pero parece que no hay datos publicados sobre este aspecto. Se ha informado un a_W mínimo de 0.78 a 37 ºC	Es ubicuo, aislado de aire, cereales, semillas. Está implicado en alrededor del 10% de los casos de aspergilosis pulmonar humana, y en una amplia gama de otras afecciones, como infecciones cutáneas y oftálmicas.	Producen un amplio rango de metabolitos de los cuales solo los territrems parecen tener una toxicidad significativa.	Colonias en CYA 40-50 mm diám, planas, bajas y velutinosas, micelio blanco; gran producción conidial color marrón rosáceo pálido a rubio; reverso pálido a marrón apagado o marrón amarillento.	Conidióforos nacidos de hifas superficiales, estipes de 100-250 mm de largo, paredes lisas; vesículas de 15-20 mm de diámetro, fértiles sobre el hemisferio superior, con métulas y fiálides densamente apretadas, cortas y estrechas, ambas de 5-8 mm de largo; conidios esféricos, muy pequeños, de 1,8-2,5 mm de diámetro, paredes lisas, en la madurez nacen en columnas largas y bien definidas.
Cladosporium spp. (Figura 6)	Hongos de crecimiento lento. Presenta especies capaces de crecer a bajas actividades de agua (a_W 0.86) a 25 ºC. Presenta especies que crecen por debajo de los 10 ºC siendo contaminante de productos congelados.	Es uno de los géneros ambientales aislados con mayor frecuencia. Típicamente aislado en muestras de aire. Los conidios de *Cladosporium spp.* Están particularmente bien adaptados a la dispersión aérea.	No se han detectado micotoxinas producida por estas especies	En cultivo se observan colonias bajas, densas, aterciopeladas de color verde oliva. El reverso de la colonia es típicamente azul profundo-negro, iridiscente que no es muy común en los hongos de crecimiento lento.	Las estructuras reproductivas son frágiles, presenta conidióforos parecidos a árboles, que se ramifican irregularmente al gestarse desde las células más jóvenes. Los conidios en forma (no en color) se asemejan a levaduras, sin embargo las paredes son gruesas de color oliva y a menudo rugosas.

Tabla 6.(Continuación) *Características ecofisiológicas y morfológicas macro y microscópicas de los principales contaminantes fúngicos en las industrias farmacéutica y cosmética.*

Género	Fisiología	Características generales		Características morfológicas (sobre CYA y MEA 25 ºC)	
		Ecología	Producción de micotoxinas	Macroscópicas	Microscópicas
Alternaria spp. (Figura 5)	Hongos de crecimiento lento. La temperatura óptima para el crecimiento de *Alternaria spp.* es a 25 ºC, con algunos pocos reportes de crecimiento a 6 ºC y hasta 36 ºC	Estas especies se conocen como el mayor patógeno de tomates frescos. Aunque pueden atacar numerosas especies de vegetales y frutas. Además se han aislado de cereales, principalmente de trigo, arroz y girasol.	La principal toxina producida es el ácido tenueazónico, compuestos menos tóxicos incluyen el alternariol, alternariol mono-metil-éter, altenueno y altertoxin I, II y III.	Micelio flocoso de color blanquecino a marrón grisáceo. Reverso marrón o casi negro	*Alternaria spp.*, produce conidios grandes, marrones, con septos longitudinales y transversales con un estrechamiento cónico distintivo o "pico" en el extremo apical
Fusarium spp. (Figura 7)	Hongos de crecimiento lento. Dada la gran variedad de especies tienen un amplio rango de crecimiento que varía entre los -3 ºC a los 31 ºC, encontrando especies psicotróficas.	Las especies del género fusarium son aisladas de suelo y de una amplia variedad de plantas a lo largo de todo el mundo. Son típicamente contaminantes "a campo" de cereales y legumbres ocasionando diversas enfermedades en los cultivos	Diversas especies dentro del género producen una gran variedad de micotoxinas. Las principales son fumonicinas, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T2 y HT2,	Las colonias se observan suaves algodonosas en colores que van del blanco amarillento al salmón pálido o rosado. El color y la morfología de la colonia sobre APG son características de cada especie y se utiliza para la identificación.	La característica principal del género son los macroconidios, conidios fusiformes (forma de banana) segmentados que nacen de una célula pie. Muchas especies también producen conidios más pequeños, de una o dos células llamados microconidios que nacen a partir de fiálides.
Penicillium spp. (Figura 8)	Hongos de crecimiento lento. Dada la gran variedad de especies (más de 150) su fisiología es muy diversa. Se reconocen dentro del género especies capaces de crecer en condiciones de refrigeración (4 ºC)	Las especies de *Penicillium* son ubicuas y saprófitas oportunistas. Nutricionalmente son extremadamente poco exigentes, siendo capaces de crecer en cualquier ambiente con solo algunas sales minerales como así también en sobre las formas más complejas del carbono y en una amplia gama de entornos. La mayoría de las especies descriptas son hongos de suelo.	Diversas especies dentro del género son capaces de producir una gran variedad de micotoxinas	Existe una extremada variedad. La producción de conidios suele ser abundante dando a las colonias colores que van del verde, verde oscuro, verde oliva, grisáceo turquesa.	Cadenas de conidios unicelulares son producidos de forma basípeta desde las fiálides (célula conidiogénica especializada). Las fiálides pueden ser individuales, agrupadas o formando ramificaciones (métulas y luego fiálides). El conidióforo tiene la típica forma de pincel.
Stachybotrys spp.	Crecimiento moderadamente rápido, por lo general, madura dentro de los 7 días, pero requiere un alto contenido de celulosa. Necesita a_W >0,9 para su crecimiento.	Se encuentra en paredes domiciliarias (moho negro de las paredes) dañadas por el agua. Implicado en el síndrome del edificio enfermo	Diversos tipos de Tricotecenos que afectan a los humanos después de la ingestión, inhalación o absorción percutánea	La superficie es blanca al principio, convirtiéndose en gris oscuro a negro con la edad. El reverso es primero blanco y luego oscuro.	Las hifas son septadas, conidióforos simples o ramificados formando clusters de 3-10 fiálides. Los conidios son células oscuras de 4,4 a 9 micras, que forman se agrupan sobre las fiálides.

Contaminación fúngica en los productos cosméticos

La mayoría de los productos cosméticos requieren la adición de conservantes para evitar la contaminación microbiana y la rancidez, deben producirse en un entorno higiénico perfectamente limpio, por lo cual los equipos, instrumentos, tanques de almacenamiento y recipientes deben mantenerse con un nivel de limpieza alto.

La seguridad microbiológica es uno de los parámetros de calidad más dinámicos y críticos de los cosméticos. Hongos filamentosos y levaduras tales como *Penicillium* spp. *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* fueron encontrados en máscaras de pestañas, lápiz labial y delineador de ojos en diversos niveles de contaminación. La industria cosmética tiene muchas razones convincentes para establecer y mantener la calidad microbiológica de sus productos. Como estos productos rara vez se producen bajo condiciones estériles, es fundamental controlar adecuadamente los numerosos factores que intervienen en la microbiología de los productos. Estos factores incluyen: la calidad de la materia prima, higiene y capacitación del personal de fabricación, establecimiento de diseño y materiales sanitarios, aplicación del diseño y control del proceso de limpieza y sanitización validados, aplicación de factores químicos / físicos generales que incluyen calor, pH, adición de conservantes químicos y uso de envases de barrera apropiados. Todos estos factores son efectivos para el control de riesgos microbiológicos en los productos cosméticos.

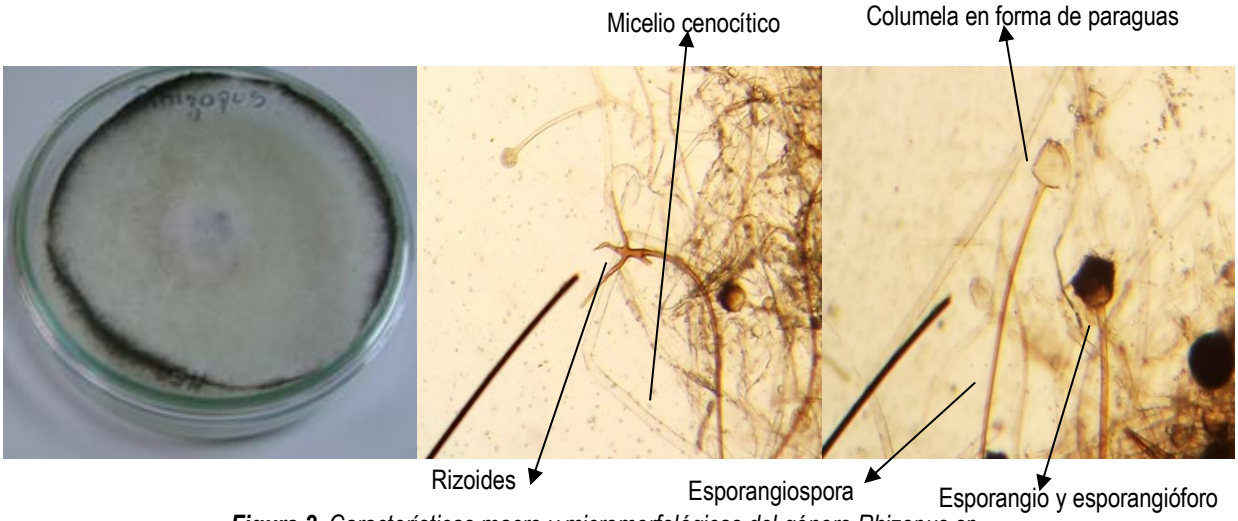


Figura 2. *Características macro y micromorfológicas del género Rhizopus sp.*

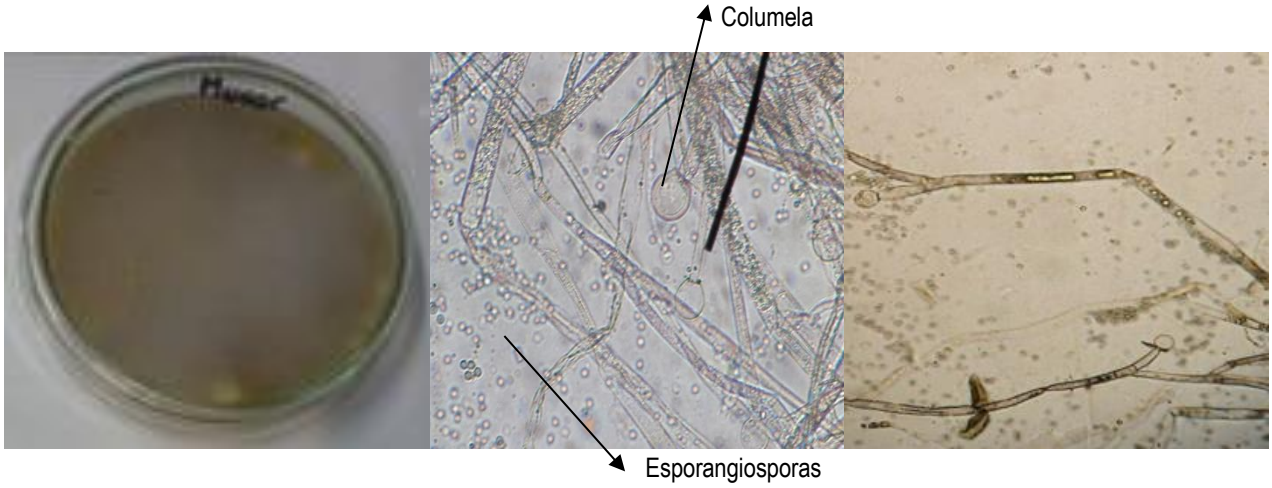


Figura 3. *Características macro y micromorfológicas del género Mucor sp.*

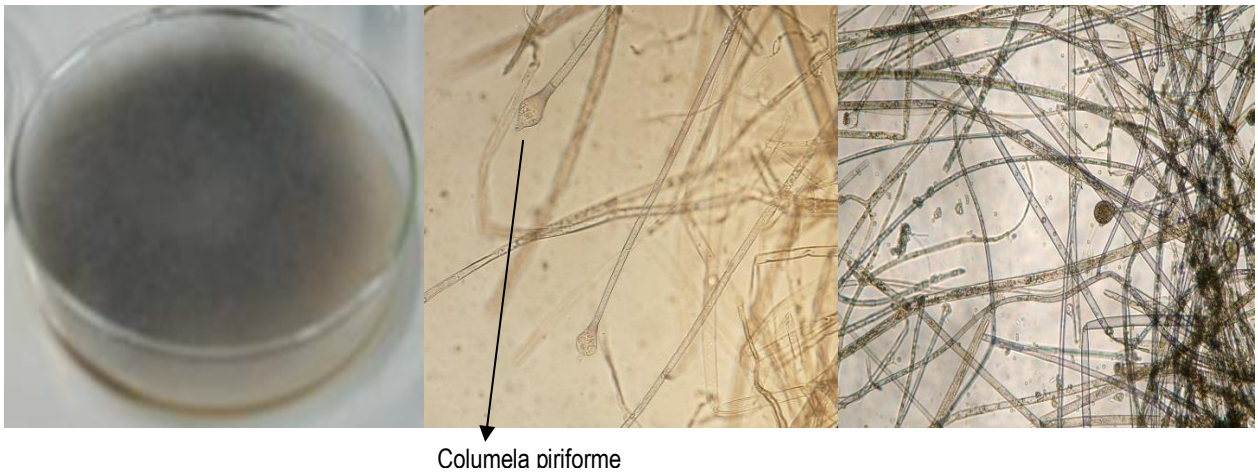


Figura 4. *Características macro y micromorfológicas del género Absidia sp.*

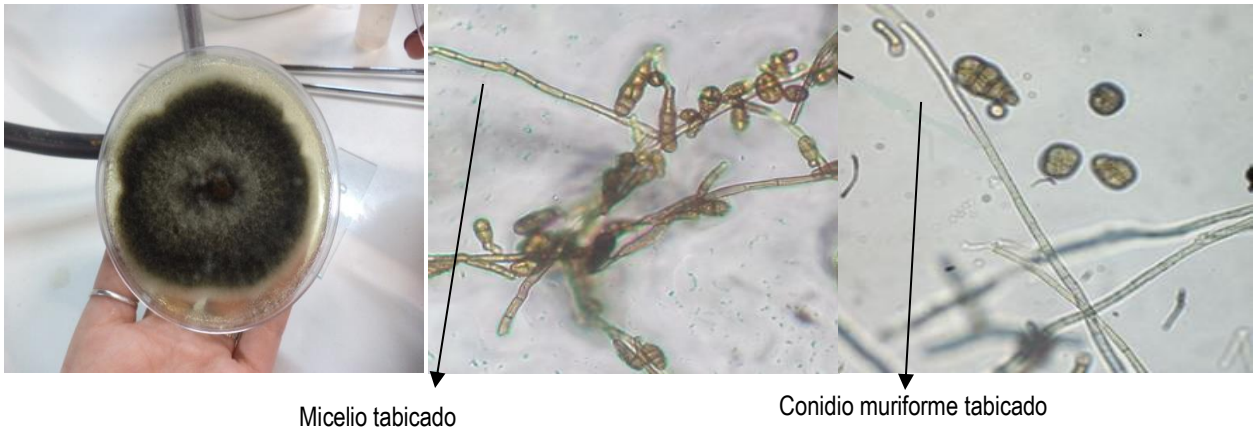


Figura 5*. Características macro y micromorfologicas del género Alternaria sp.*

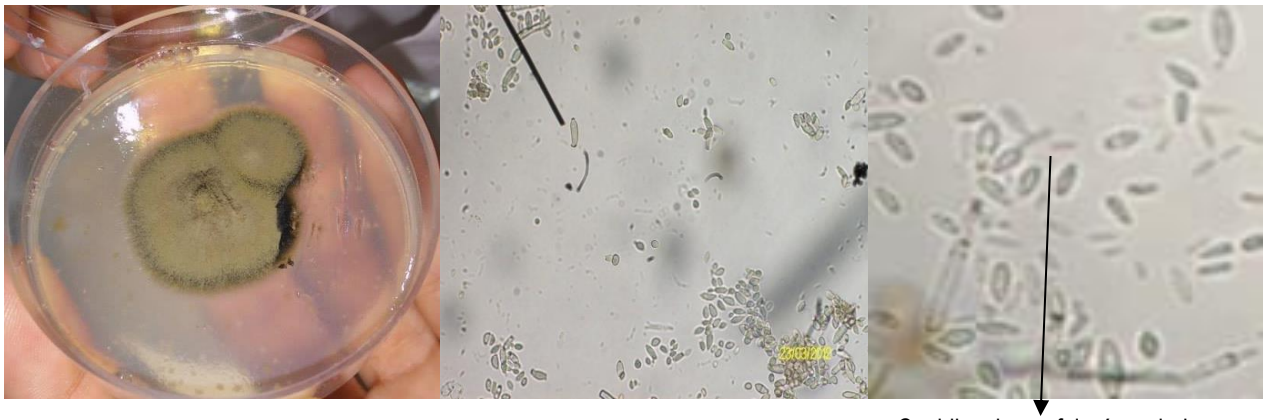


Figura 6*. Características macro y micromorfológicas del género Cladosporium sp.*

***Figura 7**. Características macro y micromorfológicas del género Fusarium sp.*

***Figura 8**. Características macro y micromorfológicas del género Penicillium sp.*

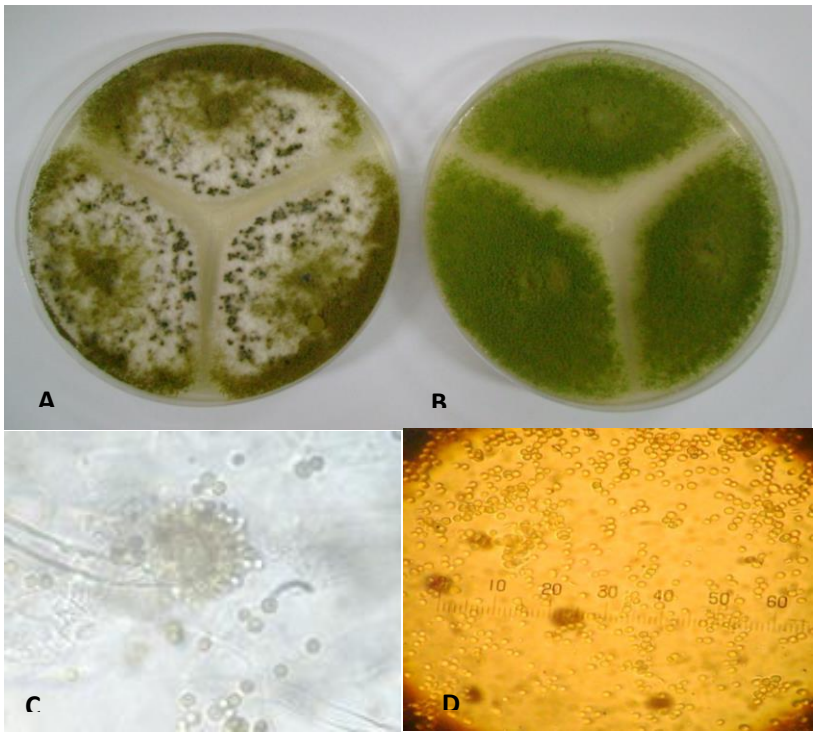


***Figura 9**. Características macro y micromorfológicas de Aspergillus flavus. A) macro morfología en CYA 25 ºC se observan esclerocios. B) macromorfología en MEA 25 ºC. C) Micromorfología, conidióforo uniseriado y conidios. D) Conidios*

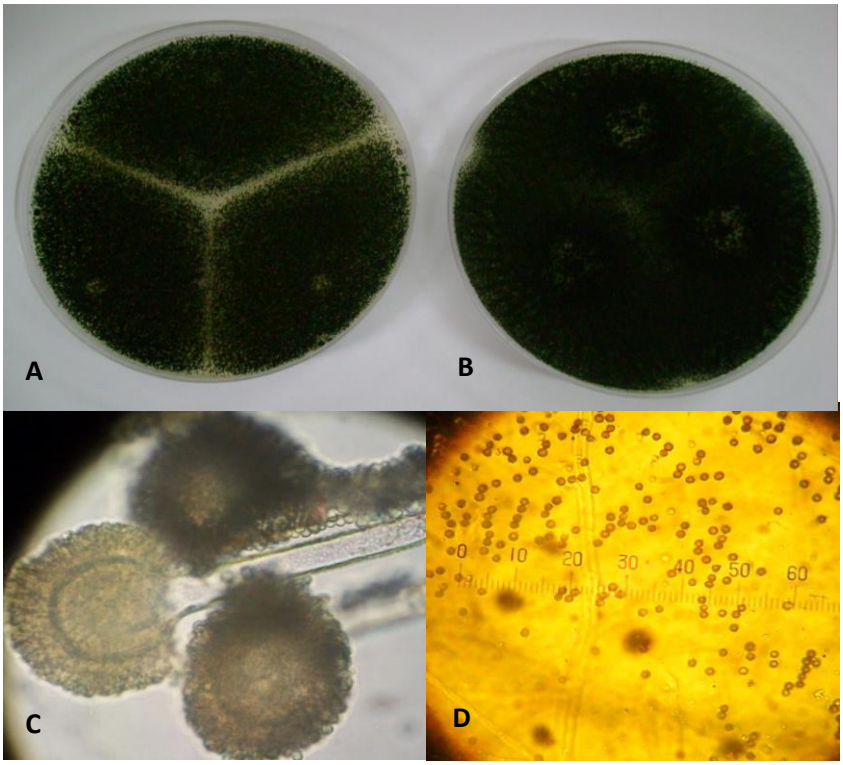


***Figura 10**. Características macro y micromorfológicas de Aspergillus niger. A) macro morfología en CYA 25 ºC. B) macromorfología en MEA 25 ºC. C) Micromorfología, conidióforo uniseriado (fiálides) y conidios. Cabeza conidial radiada. D) Conidios.*

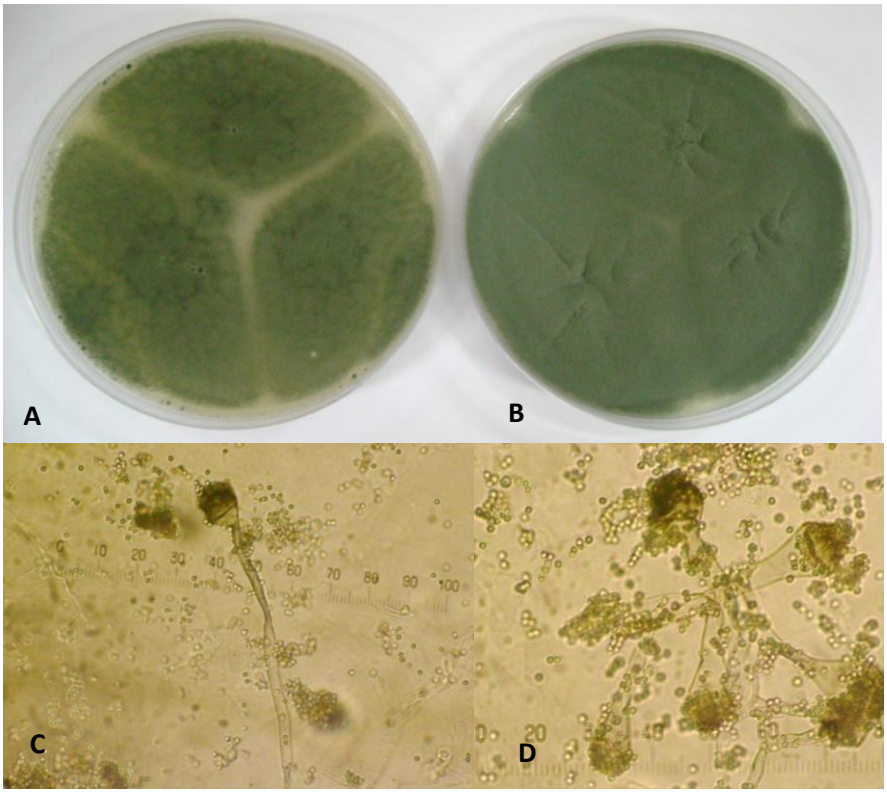


***Figura 11**. Características macro y micromorfológicas de Aspergillus fumigatus. A) macro morfología en CYA 25 ºC. B) macromorfología en MEA 25 ºC. C y D) Micromorfología, conidióforo uniseriado (fiálides) y conidios. Cabeza conidial columnar.*

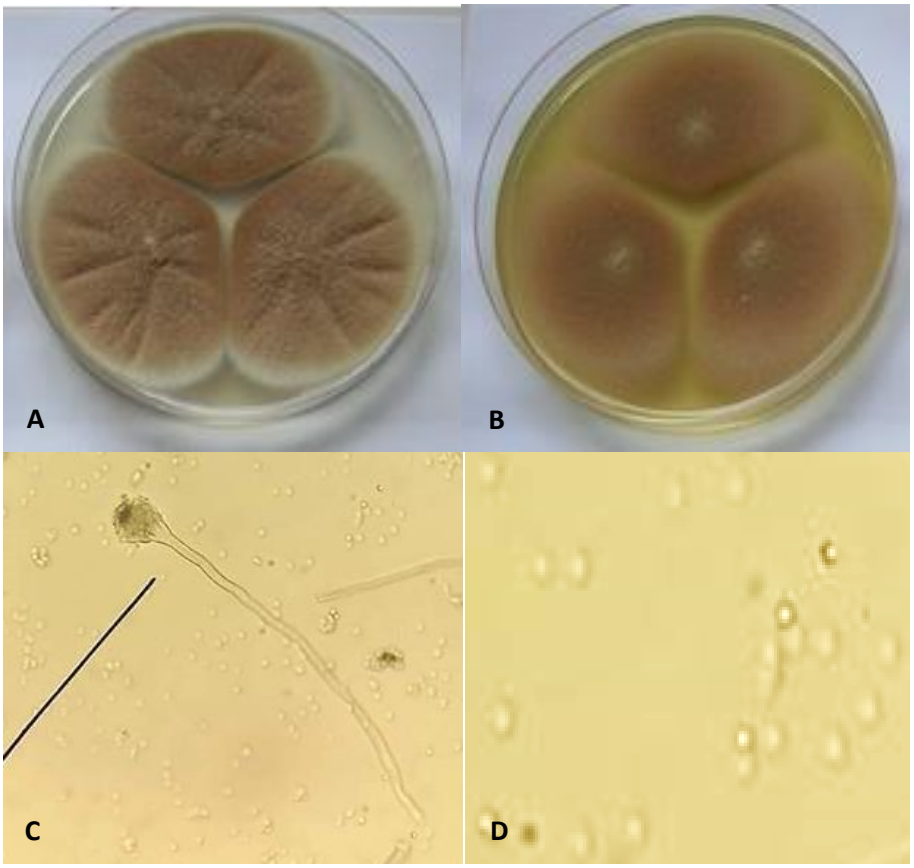


Figura 12. *Características macro y micromorfológicas de Aspergillus terreus. A) macro morfología en CYA 25 ºC. B) macromorfología en MEA 25 ºC. C y D) Micromorfología, conidióforo biseriado (métulas y fiálides). D) conidios.*

Levaduras

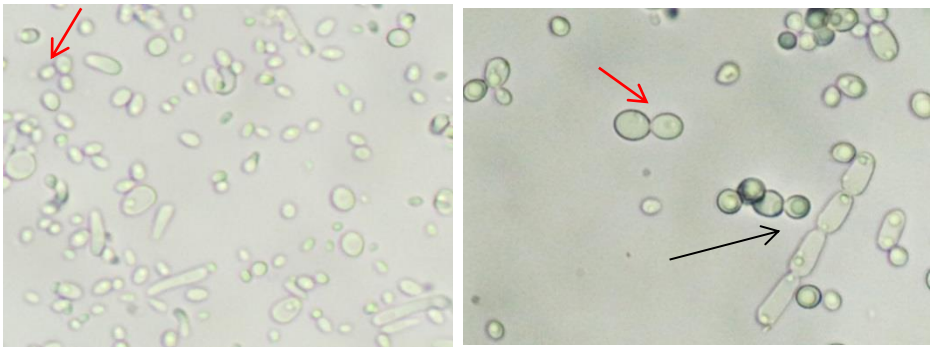
Características generales de levaduras.

Las levaduras son hongos unicelulares que se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ambientes. En general, la morfología de las colonias crecidas en medios sólidos muestra una gran diversidad en términos de color, textura, aspecto y forma. En cuanto al color de las colonias se pueden visualizar como color crema (por ejemplo, *S. cerevisiae*); blanco (*Geotrichum candidum*); negro (*Aureobasidium pullulans*); rosa (*Phaffia rhodozyma*); rojo (*Rhodotorula rubra*); naranja (*Rhodosporidium* spp.) y amarillo (*Cryptococcus laurentii*). Se dividen asexualmente por la gemación o fisión y cuyo tamaño celular individual puede variar ampliamente de 2-3 µm a 20-50 µm de longitud y 1-10 µm de ancho. Se pueden observar bajo el microscopio la formación de pseudohifas, pseudomicelio o un micelio verdadero (Figura 13). Dependiendo de las condiciones de crecimiento pueden tener reproducción sexual con la formación de ascosporas o basidosporas. La mayoría de las especies de levaduras prosperan en condiciones cálidas, azucaradas, ácidas y aeróbicas [(23)].

Las levaduras tienen necesidades nutricionales relativamente simples y la mayoría de las especies podrían sobrevivir bastante bien en condiciones aeróbicas si se les suministrara glucosa, sales de amonio, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento. Necesitan macronutrientes (fuentes de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio) y micronutrientes (oligoelementos como calcio, cobre, hierro, manganeso y zinc) necesarios para el crecimiento de la célula fúngica. En términos de requerimientos de oxígeno, la mayoría de las levaduras son aerobios. Aunque algunas especies como *S. cerevisiae* a veces se denominan anaerobios facultativos. En cuanto a la temperatura, el rango para el crecimiento de hongos es bastante amplio, pero en general la mayoría de las especies crecen en condiciones óptimas a 25 °C. Se requiere una alta actividad de agua, a_W, para el crecimiento de la mayoría de las levaduras, con un mínimo de alrededor de 0.65. El agua es absolutamente esencial para el metabolismo, y cualquier condición externa que resulte en una menor disponibilidad de agua para las células (es decir, "estrés hídrico") afectará adversamente a la fisiología celular.

Especies como *Zygosaccharomyces rouxii* capaces de crecer en condiciones de bajo potencial de agua (altas concentraciones de azúcar o sal) se conocen como osmotolerantes o zerotolerantes. En cuanto al pH, la mayoría de los hongos son acidiófilos y crecen bien entre pH 4 y 6, pero muchas especies pueden crecer, aunque en menor medida, en condiciones más ácidas o alcalinas (alrededor de pH 3 o pH 8, respectivamente). Por último, otros parámetros físicos que influyen en la fisiología de los hongos incluyen la radiación (la luz o los rayos UV pueden provocar la diferenciación micelial y la esporulación en algunos hongos que producen esporas transportadas por el aire), aireación, presión, fuerza centrífuga y tensión mecánica de corte [23].

Figura 13. *Características microscópicas de levaduras. Células en gemación (→), B) Pseudohifas (→).*



Importancia y características de géneros de levaduras relacionadas a la industria farmacéutica y cosmética.

Las levaduras se encuentran entre los hongos causantes de enfermedades importantes en humanos y animales, especialmente *Candida* spp., *Cryptococcus* (Cr.) *neoformans*, *Cr. gattii*, *Trichosporum* spp., *Malasezia* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp. y *Pseudozima* spp.

De las especies de levaduras encontradas en productos farmacéuticos las aisladas con mayor frecuencia pertenecen al género *Candida* sp. Existe una relación comensal de un gran número de especies del género *Candida* como residente normal del tracto gastrointestinal de humanos, tejido muco-cutáneo y piel. Especies de este género pueden ser patógenas oportunistas produciendo diferentes infecciones. Estas infecciones denominadas "candidiasis" se han vuelto cada vez más comunes durante las últimas décadas debido a varias razones, las cuales incluyen principalmente el uso de terapias inmunosupresoras y el mejoramiento de las herramientas de diagnósticas, que han contribuido a la sensación de que la candidiasis ha aumentado en importancia como una aflicción de humanos y animales. Además del cuerpo humano y animal, *Candida* spp. puede encontrarse en una amplia variedad de ambientes como aire, agua, alimentos, vestimenta, utensilios de limpieza personal, etc. Sin embargo, el aislamiento ambiental de *Candida* spp., que son regularmente asociadas con infecciones es a menudo resultado de la contaminación por humanos o animales en lugar de reflejar el verdadero hábitat primario de hongos [24]. Como levadura, *Candida* spp., se caracteriza por presentar colonias cremosas de crecimiento rápido de colores blanco a crema. Forma células globosas, elipsoides, cilíndricas o elongadas y algunas veces pseudomicelios y micelio verdadero que se reproducen asexualmente por gemación. Candida albicans es la especie más importante y estudiada de este género, es una especie patógeno oportunista capaz de producir diferentes tipos de patologías. Las pruebas de producción de clamidospora terminal y producción de tubo germinal son las utilizadas para la identificación de esta especie en el laboratorio. Otras especies del género son *C. tropicalis, C. krusei, C. dubliniensis* y *C. glabrata*.

Otros géneros de importancia que se han aislado de productos farmacéuticos o cosméticos son *Trichosporum* sp., *Cryptococcus* sp., y *Rhodotorula* sp.

Si bien, no se ha encontrado incidencia de especies del género *Trichosporum* sp. en los productos farmacéuticos, es importante tener conocimiento, ya que se han aislados de alguna parte del cuerpo de los profesionales de la salud o que están en contacto con áreas limpias dentro de la industria. Las células se caracterizan por presentar un micelio verdadero, con artroconidios y blastoconidios hialinos unicelulares y simples como estructuras de

reproducción sexual. En medio sólido, las colonias son color crema, húmedas o secas y se pueden tornar con aspecto de harina con el tiempo. Son ureasa positiva y no fermentan azúcares [25].

Las levaduras del género *Cryptococcus* se caracterizan porque sus células son esféricas, ovoides, elongadas o apiculadas con reproduccion asexual a través de gemación polar o multilateral. En medio sólido, las colonias son blancas o crema, aunque algunas especies producen pigmentos de color rojo, amarillo o marrón y las células presentan cápsula de polisacáridos. La capsula da una apariencia mucoide a las colonias. Todas las especies usan el D-Glucuronato y son ureasa positiva. Las especies de *Cryptococcus* están ampliamente distribuidas y se encuentran desde los trópicos hasta las regiones árticas y antárticas, donde son capaces de colonizar el filoplano y los tallos de las plantas de diferentes clases, en las heces de animales y en hábitats acuáticos. Estudios recientes han demostrado que es uno de los géneros de levaduras predominante en el suelo [26].

Especies del género *Rhodotorula* han sido aisladas de productos de la industria farmacéutica. Este género es fácilmente reconocido debido a que en un medio de cultivo sólido se observan colonias de colores rojo, rosado salmón a naranja. Las células son esféricas, ovoides o elongadas y algunas especies pueden formar pseudomicelio o micelio verdadero. Se reproduce asexualmente por gemación multipolar o polar [25].

Identificación de levaduras

En general, las levaduras en medio de cultivo solido forman colonias similares a las formadas por las bacterias. Para obtener un cultivo puro, es necesario deslizar con un ansa en rulo sobre una colonia, colocar el inóculo en un tubo conteniendo 2 – 3 ml de agua estéril o agua peptonada (0,1%) y realizar estrías por agotamiento. La técnica de estría por agotamiento utilizada para el aislamiento de colonias de bacterias es adecuada para el aislamiento de levaduras (Figura 14). Si todas estas colonias individuales parecen tener un tamaño y una apariencia similares se puede considerar que el cultivo es puro [1].

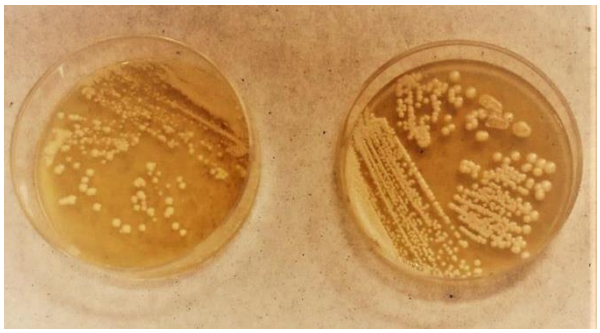


***Figura 14**. Siembra en estrías por agotamiento de las colonias de levaduras aisladas en el medio de cultivo agar extracto de malta.*

La identificación de levaduras sigue siendo una tarea difícil ya que las características morfológicas macro y microscópicas de las colonias tienen un valor limitado. En general, ha sido necesario utilizar pruebas bioquímicas y fisiológicas, como la fermentación de carbohidratos, patrones de asimilación para un rango de fuentes de carbono y nitrógeno y crecimiento a diversas temperaturas. Varios investigadores han desarrollado diferentes métodos para la identificación de levaduras [25,27,28]. Los métodos moleculares se utilizan cada vez más en la identificación de las levaduras, reemplazando las pruebas bioquímicas que requieren más tiempo para llegar a la correcta identificación.

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo considerando cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos.

1) Criterios Morfológicos:

A) Criterios macroscópicos: son criterios que tienen en cuenta los aspectos macroscópicos de las colonias al crecer en diferentes medios de cultivos. Uno de los medios por excelencia para el aislamiento e identificación es el agar glucosado de Sabouraud (ADS) con o sin antibiótico adicionado. De acuerdo a la especie el aspecto de las colonias

difiere, pero en general, son de bordes lisos o rugosos, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosas. No desarrollan micelio aéreo, aunque pueden aparecer prolongaciones en la periferia de la colonia. Una colonia de aspecto y consistencia mucoide sugiere la formación de capsulas. Las colonias de color rojo – anaranjado, de aspecto cremoso o rugoso, son características de especies pertenecientes a los géneros *Rhodotorula* o *Sporobolomyces*, debido a la síntesis de carotenoides de estos géneros (Figura 15).

***Figura 15**. Características macroscópicas de las colonias de especies de levaduras, desarrolladas en el medio de cultivo agar glucosado de Sabouraud (ADS).*

B) Criterios microscópicos:

Ciertas características microscópicas son útiles para ayudar a la identificación de algunas especies de levaduras (Figura 16).

***Figura 16**. Características microscópicas útiles para ayudar a la identificación de algunas especies de levaduras: a) artrosporas e hifa hialina; b) células con tubo germinativo en suero; c) clamidosporas.*

Prueba del tubo germinativo: el tubo germinativo es una extensión filamentosa de la célula levaduriforme, sin estrechamiento en su origen. Sólo *Candida albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales cuando es incubado en suero humano o de conejo. Sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas de aspecto similar a los tubos germinales, pero con una zona de constricción adyacente a la célula madre. Es una prueba útil para diferenciar *C. albicans* de otras especies de *Candida*.

Formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas y artrosporas: para la observación de estas estructuras se debe inocular la cepa en medio Agar Harina de Maíz con el agregado de Tween 80 (polisorbato) a una concentración final de 0,02% para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de hifas y blastoconidias. Hay que determinar primeramente si son pseudohifas (resultante del proceso de formación de blastoconididas) o hifas verdaderas que se fragmentan en artroconidias. Si hay presencia de pseudohifas y blastoconidias, la especie a identificar pertenece al género *Candida*. Si por el contrario, se observan hifas verdaderas y artroconidias, es indicio que se trate de especies de *Trichosporum*, *Geotrichum*, *Galactomyces* o *Blastoschizomyces*.

Trichosporum sp. y *Blastoschizomyces* sp. producen artroconidios y blastoconidias, éstas últimas nacen en brotes de los ángulos de las artroconidias adquiriendo la forma característica de “oreja de conejo”. Especies como *G. candidum* o *G. capitatus* producen blastoconidias a partir de un ángulo de la artroconidia formando una estructura similar a un “palo de hockey”. Candida tropicalis produce pequeñas cantidades de blastoconidias muy esparcidas o en pequeños grupos a lo largo de las hifas, mientras que las blastoconidas de *C. parapsilosis, C. kéfir* y *C. krusei*

se ordenan a lo largo de una corriente de blastoconidias. Las clamidosporas son esporas de resistencia, redonda u ovales, de 6-12 µm de diámetro, de pared gruesa. Su producción es característica de *C. albicans*.

2) Criterios Bioquímicos:

En los últimos años se han desarrollados diferentes kits comerciales para la identificación presuntiva de especies de levaduras usando criterios enzimáticos, asimilación de nutrientes, etc. A modo de informativo en la Figura 17 se observa un resumen de las técnicas más usadas.

Los métodos enzimáticos se basan en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato.

Los métodos basados en asimilación de nutrientes se fundamentan en el uso por separado de diferentes nutrientes hidrocarbonados o nitrogenados sobre un medio sintético base, para apreciar el crecimiento selectivo de una especie de levadura. Como fuente de carbono se usan azúcares y alcoholes y como substrato nitrogenado se pueden emplear peptona, asparagina, urea, sulfato de amonio, nitrato de potasio y aminoácidos diversos.

3) Criterios Inmunológicos:

Los métodos inmunológicos se basan en la aglutinación de partículas de látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico para una especie determinada. Existen diferentes métodos comerciales para la identificación de *C. albicans*, *C. cruce* y *C. dublinesas*.

4) Criterios genéticos:

Estas técnicas se basan en la caracterización e identificación de las especies utilizando marcadores moleculares. Uno de ellos es a través de la secuenciación de los genes ribosomales. Los genes ribosomales presentan una secuencia bastante conservada a nivel de género y especie en los organismos eucariotas. La técnica consiste en amplificar estas regiones conservadas por PCR (Polimerasa Chain Reaction) y posteriormente secuenciar los fragmentos amplificados.

Conclusiones

Las especies de *Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Alternaria, Curvularia* y *Fusarium* predominan en los ambientes de procesamiento farmacéutico.

Actualmente la examinación de la contaminación de dichas áreas es limitada, ya sea en términos de género o especie, debido a las dificultades para la realización de las identificaciones micológicas. Este capítulo provee una visión general de los contaminantes fúngicos habituales que ocurren dentro de las instalaciones farmacéuticas y los métodos más simples para lograr la identificación fúngica a nivel de género utilizando métodos convencionales.

En todas las farmacopeas y estándares de buenas prácticas de manufactura se mencionan los límites permitidos recomendables de partículas viables en el aire, sin embargo, no existen recomendaciones para hongos; esto es solo decidido por el microbiólogo en base a los ensayos de riesgo.

Una información útil debería incluir el tipo de productos, una revisión de las prácticas de limpieza y desinfección del lugar y un patrón de tendencia de los aislados ambientales.

El riesgo de la contaminación fúngica de los productos farmacéuticos sigue siendo un aspecto poco comprendido en la microbiología farmacéutica.

***Figura 17**. Identificación presuntiva de especies de levaduras en base a criterios bioquímicos.*

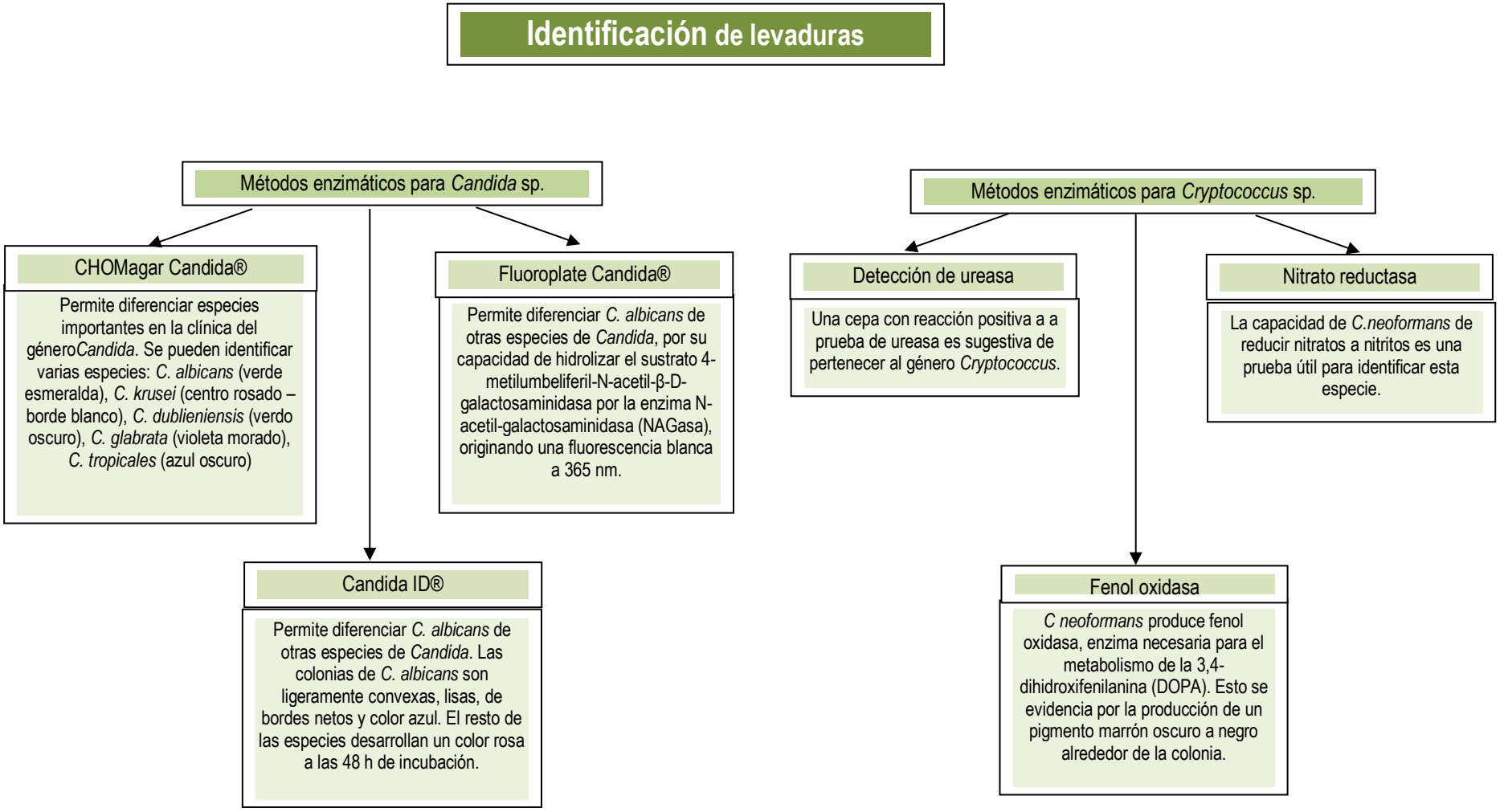
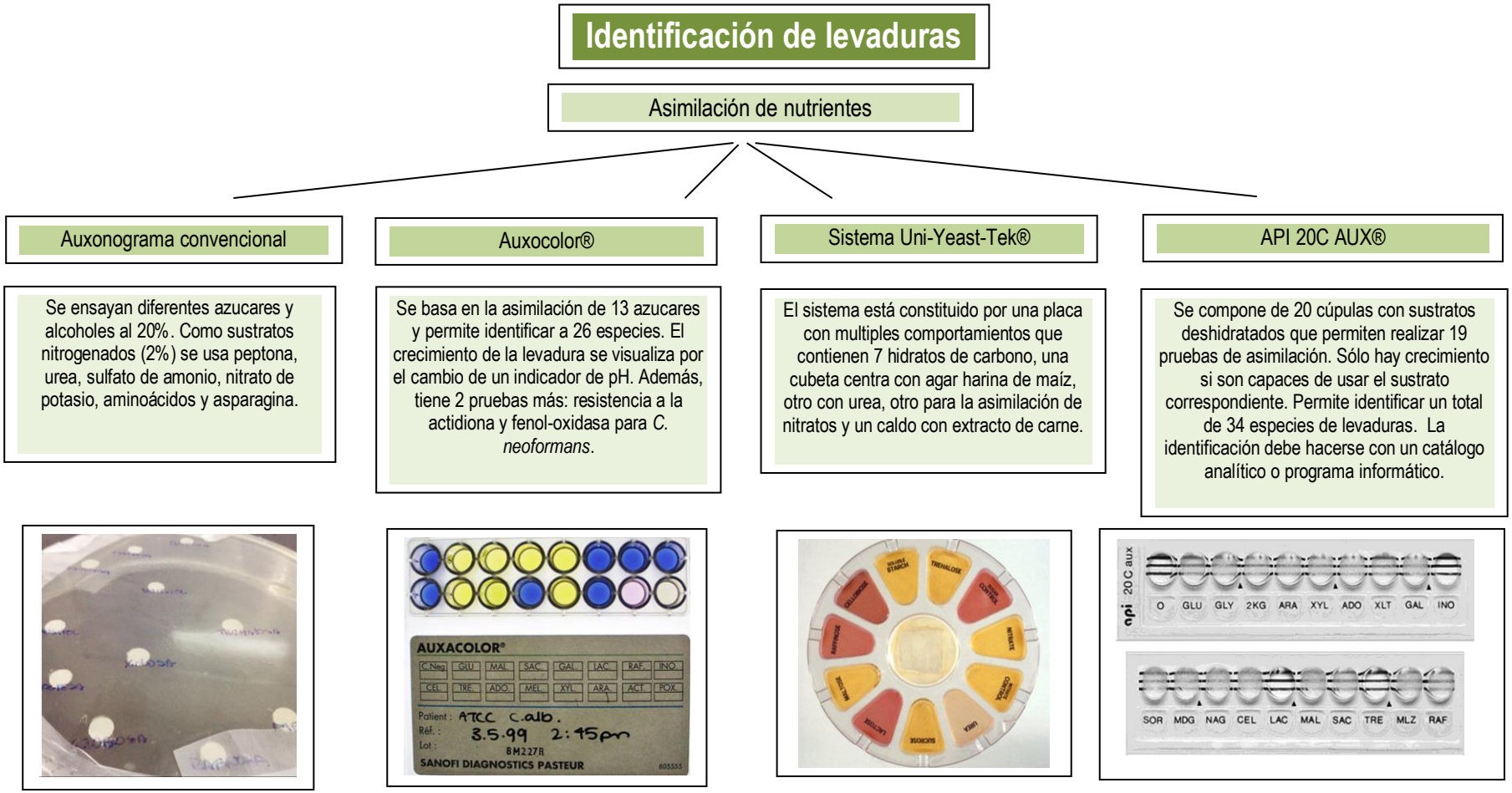


***Figura 17**. Identificación presuntiva de especies de levaduras en base a criterios bioquímicos. (Continuación).*



Bibliografía

1. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. Fungi and food spoliage. 2.ed. New York: Springer Science Business Media, LLC, 2009. 419p.
2. Dupont, B. (2002) An epidemiological review of systemic fungal infections. J Mycol Med 12, 163–173.
3. Pei-Chih W., Huey-Jen S., Chia-Yin L. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. Sci Total Environ, 253: 111-118. 2000.
4. Lacaz C.S., Porto E., Martins J.E.C., Heins-Vaccari E.M., Melo N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. Sao Paulo: Sarvier, p. 1104. 2002.
5. Huang C.Y., Lee C.C., Li F.C. et al., The seasonal distribution of bioaerosols in municipal landfill sites: a 3-yr. Atmosp Environ, 36: 4385-4395. 2002.
6. Tavora L.G.F., Gambale W., Heins-Vaccari E.M et al., Comparative performance of two air samples for monitoring airborne fungal propagules. Braz J Med Biol Res, 36: 613-616. 2003.
7. Mezzari A., Perin C., Santos Jr A.S., Bernd L.A.G., Gesu G.D. Fungos anemófilos e sensibilizacao em individuos atópicos em Porto Alegre, RS. Rev Assoc Med Bras, 49(3): 270-3. 2003.
8. Lopolito, P., Bartnett, C. and Polarine, J. Control strategies for fungal contamination in clean rooms. Control Environ 372,1 –5. 2007.
9. Diniz J.N., Moraes da Silva R.A., Miranda E.T., Mendes-Giannini M.J.S. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. Rev Saude Publica, 39 (3), 2005.
10. Burge H. Bioaerosols: prevalence and health effects in the indoor environment. J. Allergy. Clin. Immunol. 86, 687-701. 1990.
11. Castañeda Roldan E.I., Morales Polanco M., Avelino Flores F., Chávez Bravo E., Espinosa Texis A., y Morales Tepatl E. (2006). Cuantificación de bioserosoles en las áreas de proceso de una industria zapatera poblana y su relación con la salud de los trabajadores. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 26, enero-marzo.
12. Leung M. y Chan A.H. Control and management of hospital indoor air quality. Med. Sci. Monit. 12, SR17-23. 2006.
13. Fröhlich-Nowoisky, J., Kampf, C.J., Weber, B., Huffman, J.A., Pöhlker, C., Andreae, M.O., Lang-Yona, N., Burrows, S.M., Elbert, W., Gunthe, S.S., Su, H., Hoor, P., Thines, E., Hoffmann, T., Després. V.R., Pöschl, U. Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. Atmospheric Research 182 346–376, 2016.
14. Chi, H-, Yang, Y-S, Shang, S-T, Chen, J-H, Yeh, K-M, Chang, F-Y, Lin, J-C. Candida albicans versus non-albicans bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 44(5): 369-375. 2011.
15. Fazeli M.R., Nejad H.B., Mehrgan H., Elahian L. Microbial contamination of preserved ophthalmic drops in outpatient departments: possibility of an extended period of use. DARU Volume 12, No. 4, 2004.
16. Feghhi M., Mahmoudabadi A.Z. & Mehdinejad M. Evaluation of fungal and bacterial contaminations of patient-used ocular drops. Medical Mycology. 46, 17-21. 2008.
17. Vijakumar R., Sandle T., Manoharan C. A review on fungal contamination in pharmaceutical products and phenotypic identification of contaminants by conventional methods. European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Science, 17 (1): 4-18, 2012.
18. Chang, D.C., Grant, G.B., O'Donnell, K., Wannemuehler, K.A., Noble-Wang, J., Rao, C.Y., Jacobson, L.M., Crowell, C.S. et al. (2006) Multistate outbreak of Fusarium keratitis associated with use of a contact lens solution. J Am Med Assoc 296, 953–963.
19. Ahearn, D.G. and Stulting, R.D. (2014) Fungi associated with drug recalls and rare disease outbreaks. J Ind Microbiol Biotechnol 41, 1591–1597.
20. Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S. et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin, Nature 498, 367–370. 2013.

21. Sutton, S. How to Determine if an Organism is 'Objectionable', Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter, 12 (7): 2-9. 2006.
22. Cepero de García, M. C., M. L. Arboleda, F. Barraquer and E. Grose. Fangal keratitis caused by Metarhizium anisopliae var anisopliae. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 35: 361-363. 1997.
23. Waler G., y White N. Introduction to Fungal Physiology. Fungi: Biology and Applications. Edited by Kevin Kavanagh © 2005 John Wiley & Sons, Ltd. 2005.
24. Cooper CR. Yeast pathogenic to humans. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. (Eds). The yeasts: A taxonomic study. Elsevier. The United States, pp 9-19. 2011.
25. Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. Yeast: Characteristics and identification, Third edition. Cambridge university press, NY. 2000.
26. Renker, C.V., Blanke, B., Borstler, J., Heinrichs & Buscot F. Diversity of Cryptococcus and Dioszegia yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. FEMS Yeast Research 4: 597-603. 2004.
27. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed. Amsterdam: Elsevier. 1998.
28. Kurtzman, C.P., Boekhout, T., Robert, V., Fell, J.W. and Deak, T. Methods to identify yeasts. In Yeasts in Food, eds T. Boekhout and V. Robert. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. pp. 69–121. 2003.
29. Maldonado-Vega M., Peña-Cabriales J.J., de los Santos Villalobos S., Castellanos-Arévalo A., Camarena-Pozos D., Arévalo-Rivas B., Valdés-Santiago L., Hernández-Valdez L.J, Guzmán de Peña D.L. Bioaerosoles y evaluación de la calidad del aire en dos centros hospitalarios ubicados en león, Guanajuato, México. Rev. Int. Contam. Ambie. 30 (4) 351-363, 2014.
30. Herrera, K., Cóbar, O., De León, J., Rodas, A., Boburg, S., Quan, J., Pernilla, L., Mancilla, C y Gudiel, H. Impacto de la calidad microbiológica del aire externo en el ambiente interno de cuatro laboratorios de instituciones públicas en la ciudad de Guatemala y Bárcenas, Villa Nueva. VOL. 22 No 1. REVISTA CIENTÍFICA AÑO 2012.
31. Sautour M., Six N., Dalle F. et al. Profile and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. Sci Total Environ 407 (12): 3766-3771, 2009.
32. Kim K.Y., Kim Y.S., Kim D. Distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in the general hospitals of Korea. Ind Health, 48: 236-243, 2010.
33. Ortiz G., Yague G., Segovia M., Catalán V. A study of air microbe levels in different areas of a hospital. Curr Microbiol, 59 (1): 53-58, 2009.
34. Qudiesar K., Abu-Elteen A. Elkarmi M., et al., Assessment of airborne pathogens in healthcare setting. Afr J Microbiolo Res, 3 (2): 066-076, 2009.
35. Utescher C.L.A., Franzolin M.R., Luiz rachid trabulsi. Braz J Microbiol 38, 710-716, 2007.
36. Smith R., Kainer M., Finks J., Fontaine E., Reilly A., Feaster C., Purfield A., Harris J., Jerningan J. Fungal Infections Associated with Contaminated Methylprednisolone Injections. The New England J Medicine. 1599 – 1609, 2013.
37. Khor W.B., Aung T., Saw S.M., et al., An outbreak of Fusarium keratitis associated with contact lens wear in Singapore. JAMA, 295: 2867 – 2873, 2006.
38. Barry M.A., Pendarvis J., Mshar P., et al., Morbidity and mortality weekly report. Update: Fusarium keratitis – United State 2005 – 2006. Morbid Mortal Weekly Rep 55: 563 – 564, 2006.
39. Food and Drug Administration. FDA Actions: recalls and field corrections 2002. Washington, DC: FDA, 2007. Feb 1. http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotice/PublicHealthNotifications/UCM064529.
40. Hugbo P.G., Onyekweli A.O., and Igwe I. Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2 (2): 229-234. 2003.
41. Muhammed H.J. Bacterial and Fungal Contamination in three brands of cosmetic marketed in Iraq. Iraqi J Pharm Sci, Vol. 20 (1), 2011.
42. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. European Pharmacopeian 5.6. Strasbourg, France: EDQM; 2006, Chapters 2.6.13 and 2.6.12

43. Society of Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeia. Tokyo, Japan: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; 2007, amended Chapters 35.1, 35.2,7.
44. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 31st edition, amended Chapters 61, 62, 111. Rockville, MD United States Pharmacopeial Convention, 2007.