

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

---

## Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica

M<sup>a</sup> DEL CARMEN DE LA ROSA, CARLOS ULLÁN, M<sup>a</sup> PILAR PRIETO Y M<sup>a</sup> ANGELES MOSSO.

*Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. 28040.*

### RESUMEN

Se ha realizado el análisis microbiológico del aire de una zona limpia de envasado aséptico de materias primas en una industria farmacéutica con el fin de determinar los niveles y los tipos de microorganismos presentes. Se tomaron 569 muestras en siete puntos de la zona limpia durante 18 meses, mediante los métodos de gravedad e impacto (Biotest RCS Plus). La media del número de bacterias y hongos obtenidos fueron 2,4 y 2,7 ufc/30 min por el método de gravedad y 13 y 1,1 ufc / m<sup>3</sup> por el método de impacto, respectivamente. Se han encontrado más muestras con bacterias (51%) que con hongos (33%), predominando los cocos sobre los bacilos y los mohos sobre las levaduras. No se han detectado bacterias Gram negativas. Los géneros bacterianos más frecuentes han sido: *Staphylococcus* (27,4 %), *Micrococcus* (9,7%), *Bacillus* (8%), *Corynebacterium* (7,4%) y *Arthrobacter* (6,7%) y los de hongos: *Penicillium* (7,2%), *Curvularia* (6,3%) y *Aspergillus* (4,4%). La calidad microbiológica de la zona limpia ha sido elevada ya que todas las muestras han cumplido los límites de grado C y el 32% los de grado A establecidos por la Unión Europea.

**Palabras clave:** Calidad microbiológica. Aire. Zona limpia.

### SUMMARY

#### **Air microbiological quality in a clean area from a pharmaceutical industry**

Microbiological analysis of the air from a clean area used for aseptic packing of raw materials in a pharmaceutical industry has been carried out in order to determine the

microbiological levels and to identify those microorganisms present in the air. 569 samples were taken from seven different points of the clean area during 18 months, using gravity and impact (Biotest RCS Plus) methods. The average number of bacteria and fungi obtained when using the gravity method was 2.4 and 2.7 ufc/ 30 min ; 13 and 1.1 ufc/m<sup>3</sup> using the impact method. We have obtained more samples with presence of bacteria (51 %) than fungi (33%) and a prevalence of cocci over rods and molds over yeasts. Gram negative bacteria were not detected. The most frequently bacterial genera were *Staphylococcus* (24.7%), *Micrococcus* (9.7%), *Bacillus* (8%), *Corynebacterium* (7.4%) and *Arthrobacter* (6.7%) and the molds were *Penicillium* (7.2%), *Curvularia* (6.3%) and *Aspergillus* (4.4%). There is a good microbiological quality in this clean area and all the samples reached a class C limit and the 32% at the class A as established by the European Union.

**Key words:** Microbiological quality. Air. Clean area.

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos presentes en el aire del interior de los edificios (casas, escuelas, hospitales) pueden proceder del hombre, del aire exterior, polvo, madera, pintura, papel, humidificadores y otros, y han sido estudiados desde hace tiempo (24, 31). El grado de contaminación microbiana en estos ambientes está influenciado por factores tales como la frecuencia de ventilación, el número de personas presentes en la sala y la naturaleza y grado de las actividades que realizan los individuos dentro de los locales.

En las industrias también han sido estudiados los microorganismos del aire por su interés sanitario o por la alteración que pueden causar en los productos que en ellas se fabrican. Las industrias en las cuales la contaminación del aire tiene una mayor importancia son las farmacéuticas, alimentarias y de electrónica (10, 13). De todas ellas, la industria farmacéutica es la que requiere un mayor control microbiológico del ambiente, ya que los medicamentos pueden contaminarse durante su fabricación por el aire, equipos, superficies de trabajo o el personal.

Desde hace tiempo la industria farmacéutica debe cumplir unas Normas de Correcta Fabricación que garanticen la calidad microbiológica de los medicamentos (1, 3). La presencia y crecimiento de microorganismos en productos ya terminados, puede ocasionar riesgo para la salud, o bien alterar las características físico-químicas que impedirían su comercia-

lización. Por esta razón todas las zonas de producción deben mantenerse en unas condiciones higiénicas muy estrictas, con niveles mínimos de microorganismos y partículas que se denominan “zonas limpias”.

Uno de los aspectos que contemplan las guías de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos, es el control microbiológico ambiental, tanto del aire como de las superficies en distintos puntos: almacenes, zonas de producción y laboratorios de control de calidad microbiológico. Según las características requeridas, las zonas limpias se clasifican en diversos grados que son equivalentes en todos los países. La Unión Europea considera los grados A, B, C y D cuyos límites de microorganismos por m<sup>3</sup> de aire son, respectivamente, menos de 1, 5, 100 y 500.

El objeto de este trabajo ha sido determinar la calidad microbiológica del aire de una zona limpia de envasado aséptico de materias primas en una industria farmacéutica, con el fin de definir los niveles de contaminación máxima para esta zona, en función del riesgo del producto, siguiendo los criterios establecidos por las normativas para la industria farmacéutica. Los datos obtenidos en este estudio nos servirán como referencia para establecer unos límites propios de alerta y de acción que si se exceden, llevará a la industria a poner en marcha los métodos de control microbiano necesarios en cada caso. Así mismo, la identificación de los microorganismos que aparecen con más frecuencia nos llevará a saber su posible origen y tomar las medidas necesarias para evitar su entrada en la zona limpia, así como permitirá una desinfección más correcta.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo.** Las muestras se tomaron en un total de siete puntos distintos de la zona limpia de envasado de materias primas: 1, 2 y 3 (área de envasado y pesado), 4 (vestuario), 5 y 6 (esclusa de entrada y salida de materiales), y 7 (área de envasado y pesado). Los controles microbiológicos se realizaron desde el mes de Octubre de 1996 hasta el mes de Mayo de 1998. Se tomaron 89 muestras de los puntos 1, 2, 3, 4, 5, y 6; además de 35 muestras del punto 7, haciendo un total de 569.

**Recuento de microorganismos.** Se utilizó el método de gravedad para el

análisis microbiológico del aire en los puntos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Se usaron placas Petri con agar triptona soja (TSA) (5) para la detección y aislamiento de las bacterias mesófilas. Las placas se depositaron en el suelo en los puntos anteriormente descritos, abiertas en toda su superficie durante treinta minutos, y después se incubaron a 30° C durante tres días. Para el recuento y posterior aislamiento de los hongos se utilizaron placas Petri con agar Sabouraud con cloranfenicol (5), incubando durante seis días a 22-24° C. Los resultados se expresaron como ufc/30 min.

Para el método de impacto se utilizó el muestreador centrífugo *Bio-test RCS Plus Sampler*. La muestra se tomó en el centro de la sala de envasado (punto 7), y se recogió la cantidad de 0,5 m<sup>3</sup> de aire a una velocidad de 40 l/min. El número de microorganismos por volumen de aire se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Microorganismos/ m}^3 \text{ de aire} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias} \times 25}{\text{tiempo (min)}}$$

Para el recuento y aislamiento de las bacterias, se utilizaron tiras con TSA, incubando a 30° C durante tres días. Para el recuento y aislamiento de los hongos, se utilizaron tiras con agar rosa de Bengala (22), incubando durante seis días a 22-24° C. Los resultados se expresaron en ufc/m<sup>3</sup>

**Identificación de microorganismos.** Se tomaron las tres colonias más representativas de cada placa, o todas las colonias si el número era inferior a tres, anotando las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas.

La identificación de las bacterias se realizó mediante las siguientes pruebas: Morfología de la colonia y producción de pigmento, tinción de Gram, catalasa, oxidasa y oxidación/ fermentación de la glucosa (9). Además para la identificación de las cepas de cocos Gram positivos se utilizó el sistema miniaturizado API Staph (bioMérieux) y para *Staphylococcus aureus* se hizo la prueba de aglutinación Slidex Staph-Kit (bioMérieux). Para la identificación de las cepas de bacilos Gram positivos, se hicieron las pruebas citadas anteriormente y además la tinción de esporas. Las cepas de bacilos no esporulados se identificaron mediante el sistema miniaturizado API Coryne (bioMérieux).

Los hongos filamentosos se han identificado por la morfología de las colonias y por la observación microscópica de las hifas y formas de

reproducción, por la técnica de la cinta adhesiva y por microcultivos (18). Las levaduras se han identificado por la morfología de las colonias en medio sólido, observación microscópica y por las pruebas fisiológicas y bioquímicas utilizando el sistema miniaturizado API 20 C AUX (bioMérieux).

Para la clasificación de las cepas bacterianas se han utilizado los criterios del Manual de Bergey's (15, 19, 28). Para las levaduras, se utilizaron los criterios de Barnett *et al* (8), y las cepas de mohos se clasificaron siguiendo los criterios de Onions *et al* (26) y de Barnett y Hunter (7).

## RESULTADOS

**Evolución mensual del número de microorganismos por los métodos de gravedad e impacto.** La evolución mensual del número de bacterias y hongos por el método de gravedad, se especifica en las tablas 1 y 2, respectivamente. El valor medio más alto de bacterias se obtuvo en el mes de Septiembre debido a un aumento esporádico en el punto 5 (esclusa de entrada de materiales). También en este mes aparecen en este punto, valores más altos de hongos de los habituales, aunque el valor medio mayor se obtuvo en el mes de Diciembre de 1997 debido al punto 6 (esclusa de salida). La media del número de bacterias y hongos obtenidos en las distintas muestras fue de 2,4 y 2,7 ufc/30 min, respectivamente. La esclusa de entrada de materiales es el punto que ha presentado el valor medio más alto de bacterias, 4,6 y la esclusa de salida el más alto de hongos, 7,6. En la zona de envasado el número medio de bacterias y hongos determinado por el método de impacto fue de 13 y 1,1 ufc /m<sup>3</sup>. Los meses de Septiembre y Octubre fueron en los que se detectaron mayor número de bacterias por m<sup>3</sup> y en Noviembre el mayor número de hongos (Figura 1).

TABLA 1  
*Evolución mensual del número de bacterias . Método de gravedad (ufc/30 min).*

| AÑO  | MESES     | Puntos de muestreo |     |     |     |     |     | X   |
|------|-----------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|      |           | 1                  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |     |
| 1996 | Octubre   | 1,2                | 0,5 | 0,4 | 2,6 | 1,4 | 0,8 | 1,1 |
|      | Noviembre | 0,7                | 1,4 | 2   | 5,1 | 1,1 | 1,3 | 1,9 |

|                  |            |      |      |     |     |     |     |     |
|------------------|------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1997             | Diciembre  | 0,5  | 1,2  | 0,8 | 3,7 | 0,6 | 1,2 | 1,3 |
|                  | Enero      | 1,2  | 0,7  | 0,3 | 4,1 | 7,8 | 0,7 | 2,4 |
|                  | Febrero    | 0,3  | 1,3  | 0,3 | 0   | 0   | 2,3 | 0,7 |
|                  | Marzo      | 16,5 | 5    | 7,5 | 4,5 | 1,5 | 2   | 6,1 |
|                  | Abril      | 1    | 1,2  | 0,2 | 4,5 | 0,7 | 0,7 | 1,4 |
|                  | Mayo       | 0    | 0    | 0   | 1   | 0   | 0   | 0,2 |
|                  | Junio      | 1,2  | 1,2  | 1,5 | 0,2 | 0,2 | 2,7 | 1,2 |
|                  | Julio      | 0    | 11,5 | 0,5 | 1   | 2   | 3   | 3,0 |
|                  | Septiembre | 0    | 3    | 1,5 | 1,5 | 48  | 1   | 9,2 |
|                  | Octubre    | 9,7  | 1,7  | 1,2 | 2   | 1,5 | 2,7 | 3,1 |
|                  | Noviembre  | 0,3  | 2,3  | 1,3 | 1   | 1   | 1   | 1,2 |
|                  | Diciembre  | 1    | 1    | 0   | 0,5 | 0   | 0   | 0,4 |
| 1998             | Enero      | 0,5  | 0,2  | 15  | 2   | 0,5 | 0,5 | 3,1 |
|                  | Febrero    | 0,2  | 0,2  | 2   | 0,5 | 17  | 1,2 | 3,5 |
|                  | Marzo      | 0,6  | 1,6  | 0,8 | 1,2 | 0,8 | 0,6 | 0,9 |
|                  | Abril      | 8    | 1    | 2   | 1,2 | 0,3 | 1   | 2,3 |
| <b>TOTAL (X)</b> |            | 2,4  | 1,9  | 2,1 | 2,1 | 4,6 | 1,3 | 2,4 |

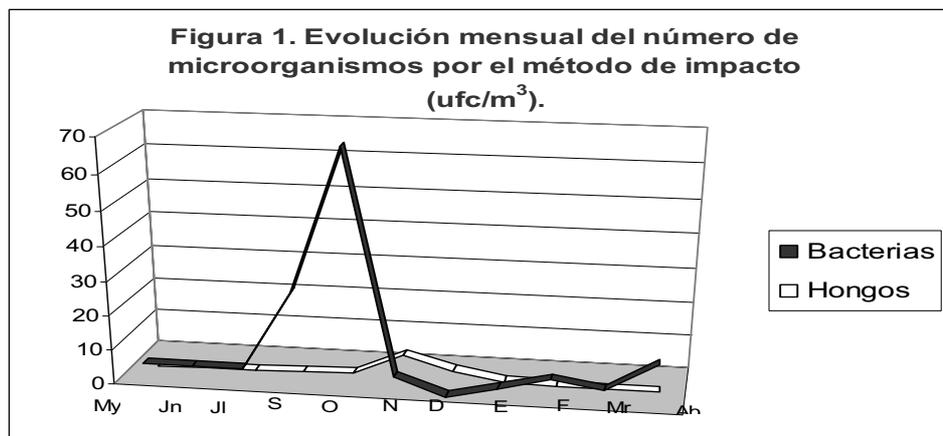
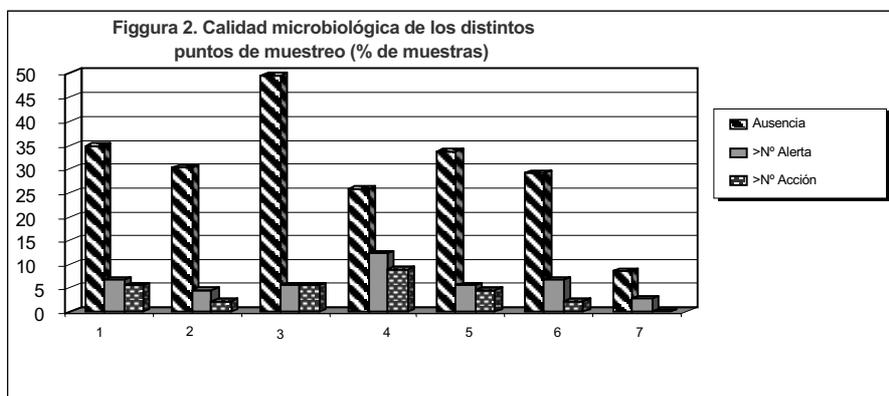


TABLA 2  
Evolución mensual del número de hongos. Método de gravedad ( $ufc/30min$ ).

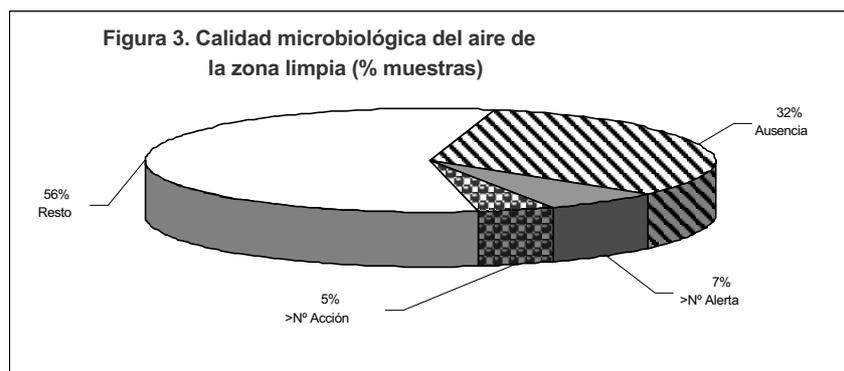
| AÑO  | MESES     | Puntos de muestreo |     |     |     |     |     | X   |
|------|-----------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|      |           | 1                  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |     |
| 1996 | Octubre   | 0,3                | 0,4 | 0,2 | 0,5 | 1,3 | 0,3 | 0,5 |
|      | Noviembre | 3,1                | 1,5 | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 3,6 | 2,0 |

|         |                  |       |     |     |     |     |     |      |
|---------|------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|         | Diciembre        | 0,3   | 0,4 | 0,7 | 1,2 | 1,3 | 0,9 | 0,8  |
| 1997    | Enero            | 0,4   | 0,6 | 0,1 | 0,7 | 0,9 | 1   | 0,6  |
|         | Febrero          | 0     | 0   | 0,3 | 0,3 | 0   | 0,3 | 0,1  |
|         | Marzo            | 0,5   | 0,5 | 0   | 4,5 | 0,5 | 0,5 | 1,1  |
|         | Abril            | 0     | 0,2 | 0,2 | 0,8 | 0   | 0   | 0,6  |
|         | Mayo             | 0     | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0,3  |
|         | Junio            | 0,5   | 0,2 | 0,2 | 0   | 1   | 0   | 0,3  |
|         | Julio            | 0,5   | 0   | 0,5 | 0   | 0   | 0   | 0,2  |
|         | Septiembre       | 18,5  | 0   | 2,5 | 0,5 | 30  | 1   | 8,7  |
|         | Octubre          | 0     | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 1,2 | 1,2 | 0,6  |
|         | Noviembre        | 0,3   | 0,3 | 0,3 | 0,7 | 0   | 1   | 0,4  |
|         | Diciembre        | 4     | 5,5 | 26  | 17  | 8,5 | 122 | 30,5 |
|         | 1998             | Enero | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 1   | 0   | 0,2  |
| Febrero |                  | 0     | 0   | 0   | 0   | 0,2 | 0,2 | 0,1  |
| Marzo   |                  | 0     | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,2  |
| Abril   |                  | 0,3   | 0,3 | 0,3 | 6   | 2   | 3,3 | 2,0  |
|         | <b>TOTAL (X)</b> | 1,5   | 0,6 | 1,8 | 2,0 | 2,6 | 7,6 | 2,7  |

**Calidad microbiológica del aire de la zona limpia.** La calidad microbiológica de los distintos puntos de muestreo se ha evaluado determinando el número y porcentaje de muestras que presentaron ausencia de cualquier tipo de microorganismos (bacterias y hongos), así como las muestras que han superado los niveles de alerta y de acción establecidos previamente y que fueron, respectivamente, 8 y 12 ufc/30 min por el método de gravedad y 100 y 200 ufc /m<sup>3</sup> por el método de impacto. Para determinar estos niveles se ha tenido en cuenta los criterios de las Normas de Correcta Fabricación para zonas limpias (3) y las recomendaciones de AEFI (4), así como datos experimentales previos. En la figura 2 se expone el número de muestras de cada punto incluidas en estas categorías.



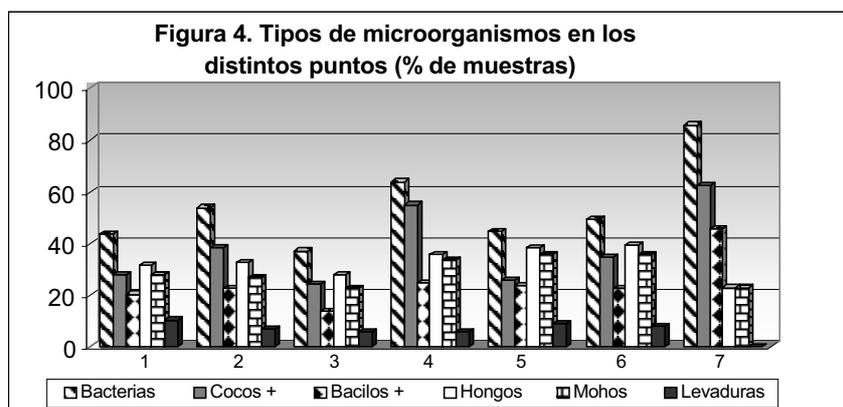
Los resultados obtenidos por los dos métodos utilizados nos indican que la calidad microbiológica ha sido buena, ya que en el 32 % de las muestras no se detectó ningún tipo de microorganismo y sólo el 7% y el 5 % superaron, respectivamente, los niveles de alerta y acción previamente establecidos (Figura 3). En el área de envasado, por el método de impacto, sólo una muestra superó el nivel de acción y ninguna el nivel de alerta y el 95% de las muestras presentaron menos de 20 ufc /m<sup>3</sup>. En esta misma zona por el método de gravedad, el 95% de las muestras presentaron menos de 7 ufc /30 min. Por tanto, todas las muestras han cumplido los límites del aire de zonas limpias de grado C e incluso el 32% está dentro de los límites establecidos para el grado A (3).



**Tipos de microorganismos.** Los resultados se exponen en las figu-

ras 4 y 5. Se han detectado mayor número de muestras con bacterias que con hongos por los dos métodos. Se han encontrado bacterias en el 51% y hongos en el 33%, siendo mayor la proporción de muestras con cocos Gram positivos que con bacilos Gram positivos y con mohos que con levaduras (Figura 5). No se encontraron bacterias Gram negativas en ninguna muestra. Por el método de gravedad, la zona del vestuario (punto 4) ha sido la que ha presentado un mayor número de muestras con bacterias, principalmente cocos Gram positivos, no encontrándose diferencias significativas en relación con los hongos, en los distintos puntos de muestreo. Por el método de impacto, la mayoría de las muestras presentan bacterias (85,7%) siendo menor el de las que tienen hongos (22,8%).

Los géneros de bacterias más frecuentemente aislados fueron : *Staphylococcus* (27,4%), *Micrococcus* (9,7%), *Bacillus* (8%), *Corynebacterium* (7,4%) y *Arthrobacter* (6,7%). Todos estos géneros se han encontrado en todos los puntos tanto por el método de gravedad como por el método de impacto (Figura 6 ). Las especies de *Staphylococcus* identificadas han sido : *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. warnerii*, *S. auricularis* y *S. saprophyticus*, siendo la especie predominante *S. epidermidis*. Las especies de *Micrococcus* se han identificado como *M. luteus* y *M. varians* predominando la primera.

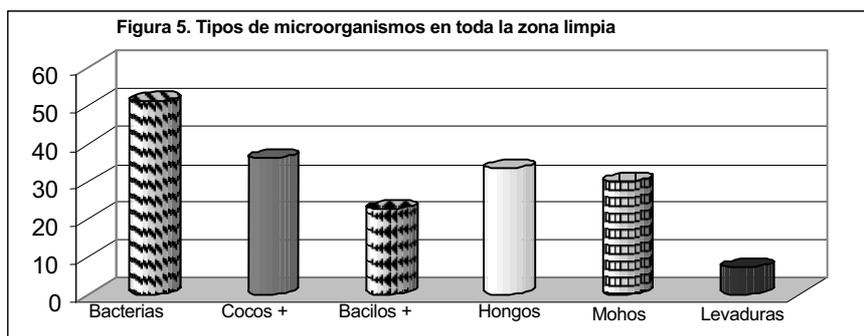


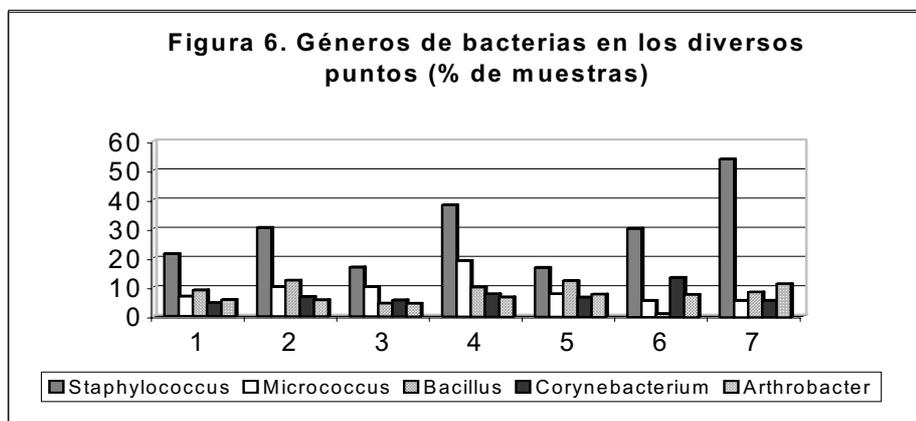
Los géneros de mohos aislados en los distintos puntos se encuentran en la tabla 3. Las muestras han presentado una gran variedad de hongos, principalmente mohos, siendo los más frecuentes : *Penicillium*

(7,2%), *Curvularia* (6,3%), *Aspergillus* (4,4%), *Alternaria* (2,8%), *Cladosporium* (2,6%) y *Paecilomyces* (2,4%) . Los géneros de levaduras identificados han sido: *Rhodotorula*, *Candida* y *Criptococcus*. Por el método de impacto se han detectado muy pocas muestras con hongos, sólo cuatro géneros de mohos diferentes y ninguna levadura.

### DISCUSIÓN

Uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica es elaborar productos con una elevada calidad microbiológica que no se contaminen con los microorganismos presentes en el aire de las zonas de producción por lo cual es necesario disponer de unas zonas limpias. Para cumplir este objetivo hay que realizar en estas zonas, un control de los microorganismos por métodos físicos o químicos y validar la eficacia de estos procesos por métodos microbiológicos.





No existe un método de muestreo de aire ideal, por lo que para elegir uno deberemos considerar qué queremos investigar, si nos interesa saber el número total de microorganismos o el de viables y su identificación. En función de estas premisas elegiremos el más adecuado, por lo que es muy frecuente la utilización de varios métodos. En este trabajo se han utilizado dos métodos : gravedad e impacto.

El método de gravedad es uno de los más antiguos, pero sigue siendo de gran utilidad (16), ya que permite identificar los microorganismos viables de los cultivos,. Sin embargo no es cualitativa ni cuantitativamente exacto porque detecta, principalmente, los microorganismos que más persisten en el aire y de mayor tamaño, por lo que se recomienda para zonas sin turbulencias. Permite conocer la distribución de los microorganismos, que no se obtiene con los muestreadores de aire forzado, para lo cual es necesario tomar muestras en distintos puntos de la zona que se controla (4).

TABLA 3  
*Géneros de mohos en los diversos puntos (nº de muestras)*

| GÉNEROS       | PUNTOS |   |   |   |   |    |   | TOTAL |
|---------------|--------|---|---|---|---|----|---|-------|
|               | 1      | 2 | 3 | 4 | 5 | 6  | 7 |       |
| Acremonium    | -      | - | - | - | 1 | -  | - | 1     |
| Alternaria    | 4      | 2 | 1 | - | 5 | 3  | 1 | 16    |
| Aspergillus   | 1      | 2 | 2 | 2 | 6 | 10 | 2 | 25    |
| Aureobasidium | -      | - | - | - | - | 1  | - | 1     |

|                  |   |   |   |   |   |    |   |    |
|------------------|---|---|---|---|---|----|---|----|
| Cladosporium     | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3  | - | 15 |
| Curvularia       | 4 | 4 | 3 | 9 | 6 | 10 | - | 36 |
| Drecheslera      | - | - | - | 1 | - | -  | - | 1  |
| Exophiala        | - | - | - | 1 | - | -  | - | 1  |
| Fusarium         | - | 1 | - | 2 | - | -  | - | 3  |
| Geomyces         | - | 1 | - | - | - | -  | - | 1  |
| Geotricum        | 1 | - | 1 | - | - | 2  | - | 4  |
| Gliocladium      | - | - | 1 | - | - | -  | - | 1  |
| Helminthosporium | - | 1 | 1 | 1 | 1 | -  | - | 4  |
| Humicola         | - | - | - | - | - | 2  | - | 2  |
| Memnoniella      | 1 | - | - | - | - | -  | - | 1  |
| Micelia sterilia | 2 | 2 | 4 | - | - | -  | - | 8  |
| Monilia          | 2 | - | - | - | - | -  | - | 2  |
| Mucor            | - | 1 | - | 1 | 2 | 1  | 1 | 6  |
| Paecilomyces     | 2 | 2 | 1 | 4 | 2 | 3  | - | 14 |
| Papulospora      | - | - | - | - | 1 | -  | - | 1  |
| Penicillium      | 4 | 5 | 6 | 6 | 6 | 10 | 4 | 41 |
| Ulocladium       | - | - | 1 | 1 | - | 1  | - | 3  |
| Verticillium     | - | - | - | 1 | - | -  | - | 1  |

El método de impacto sobre superficies sólidas es uno de los más usados en la actualidad y se han diseñado una gran variedad de aparatos (12). En este método los microorganismos se separan de la corriente de aire utilizando la inercia para forzar su sedimentación. El aparato empleado en este estudio, RCS Plus se basa en este principio pero utiliza la fuerza centrífuga para separar las partículas de una manera radial. Tiene la ventaja de ser fácilmente manejable y portátil, y se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica habiendo sido recomendado por la FDA (2) y varios autores revisados por Kaye (17).

La calidad microbiológica de esta zona limpia de envasado de materias primas apirógenas ha sido buena ya que el número de microorganismos obtenidos por los dos métodos ha sido bajo y sólo un porcentaje muy pequeño de muestras superó los niveles de alerta y de acción. Esto demuestra una gran eficacia del programa de limpieza, desinfección y control microbiológico. Los puntos de mayor riesgo fueron las esclusas de entrada y salida de materiales que presentaron una contaminación esporádica en algunos meses pero los microorganismos aportados por estos pun-

tos a la zona de envasado no fue significativa.. El aumento del número de microorganismos pudo ser debido al material de acondicionamiento y a las condiciones climáticas.

Los resultados obtenidos indican que podría disminuirse el nivel de alerta de la zona de envasado a 7 ufc/30 min y 20 ufc/m<sup>3</sup>, respectivamente, según se utilice el método de gravedad o el de impacto ya que el 95% de las muestras analizadas presentan un número menor (27).

Los datos obtenidos por el método de gravedad son semejantes a los encontrados por Pascual (27) en zonas de llenado aséptico. Por el método de impacto la contaminación microbiana de la zona de envasado ha sido menor que la encontrada en zonas limpias de la industria farmacéutica (27) y aeronáutica (14) y en zonas con ambiente controlado (21).

Algunos autores han señalado la dificultad de comparar los resultados obtenidos por el método de gravedad con los métodos cuantitativos (11). Estudios experimentales realizados han encontrado que por el método de gravedad se detecta alrededor de un 10 % de los microorganismos presentes en el aire (27). Nuestros resultados confirman estos datos cuando se compara el número de bacterias pero no en el de hongos que ha sido inferior en el método de impacto, lo que puede deberse al empleo de rosa de Bengala como agente selectivo que retarda el crecimiento de los mohos y afecta a las levaduras fotosensibles (6).

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, sin embargo no existe una población microbiana autóctona. La presencia de uno u otro tipo depende del origen (suelo, agua y seres vivos) y de su supervivencia. En nuestro estudio han predominado las bacterias a los hongos, siendo los cocos Gram positivos los más frecuentes. Estas bacterias forman parte de la micropoblación normal del hombre y pueden pasar al aire por las actividades realizadas en esta zona. La proporción de muestras con microorganismos esporulados ha sido baja a pesar de su mayor supervivencia. Estos microorganismos proceden del suelo por lo que debido a los controles que se realizan en estas zonas su número es pequeño. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores en zonas controladas (14, 21). No se han detectado bacterias Gram

negativas debido, seguramente, a su menor supervivencia ya que son muy sensibles a la desecación, temperatura y desinfectantes (25).

El género *Staphylococcus* ha sido el predominante en todos los puntos, principalmente en el vestuario, siendo *S. epidermidis* la especie más frecuente lo que confirma el origen humano de esta contaminación. También en estudios realizados por la FDA se ha encontrado que el 80% de la contaminación de estas zonas se debe al personal (4). En mucha menor proporción se ha encontrado *S. aureus*, aunque también procede del hombre, su presencia es menor y tiene menos resistencia fuera de su hábitat natural (25).

Otras bacterias encontradas han sido diversas especies del género *Micrococcus* predominando *M. luteus*. Este microorganismo de origen humano o animal es frecuente en el aire por su gran supervivencia ya que posee pigmentos carotenoides que son fotoprotectores (23) y además se ha comprobado su mayor resistencia al impacto sobre medios sólidos (29).

Los bacilos esporulados detectados pertenecen al género *Bacillus*. Proceden del suelo y se encuentran frecuentemente en el aire exterior (30) siendo menor su presencia en ambientes controlados por lo comentado anteriormente (14). También se han detectado bacilos Gram positivos, pleomórficos, denominados “corineformes” (*Corynebacterium*, *Arthrobacter*). Estas bacterias de origen tanto humano como del suelo se han encontrado frecuentemente en el aire exterior (30) y en zonas limpias (14). Estos microorganismos aunque no son esporulados tienen una gran supervivencia por la composición de su pared celular, rica en lípidos (28).

Se han detectado más mohos que levaduras en todos los puntos de muestreo, debido a que son muy ubicuos y a la mayor resistencia de sus esporas a la desecación (32). Se ha encontrado un número muy bajo pero una gran diversidad de géneros de mohos, semejantes a los encontrados en el aire exterior (20). Los géneros detectados más frecuentemente (*Penicillium*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Paecilomyces*) predominan en el aire exterior y en el interior (4, 32). Todos ellos pertenecen al grupo de los Deuteromicetos cuyas esporas asexuales son captadas fácilmente por los muestreadores de aire y crecen bien en los

medios sólidos empleados. No hay unanimidad en qué género es el predominante en ambientes cerrados lo que puede ser atribuido a las diversas técnicas de muestreo, medios de aislamiento, temperaturas de incubación y las diversas zonas geográficas (32).

Por el método de impacto se ha encontrado una menor diversidad de géneros de mohos y no se han detectado levaduras en ninguna muestra, lo que puede deberse al efecto que sobre estos microorganismos ejerce el impacto sobre las superficies de los medios, a los agentes selectivos de los mismos y a la desecación. El género de levaduras más frecuente ha sido *Rhodotorula* que posee un pigmento rosa fotoprotector por lo que se encuentra con frecuencia en el aire (30).

Por los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que la contaminación microbiana de la zona de envasado, fundamentalmente de origen humano, ha sido baja, cumpliendo los límites de las zonas limpias de grado C e incluso un número alto de muestras cumplió los límites establecidos para el grado A por las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de la Comunidad Europea (3), al no detectarse ningún tipo de microorganismo. Se ha confirmado la conveniencia de utilizar dos métodos distintos de muestreo para obtener un mejor conocimiento, no sólo del número de microorganismos sino de su diversidad y localización en estas zonas.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANÓNIMO. 1985. B.O.E. 30-4-1985, **103**, 11997-12000.
- (2) ANÓNIMO. 1987. Food and Drug Administration. Guidelines on sterile drugs products. Fed. Std. 209 c.
- (3) ANÓNIMO. 1992. Guía de normas de correcta fabricación de medicamentos de la Comunidad Europea. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- (4) ANÓNIMO. 1996. Programa de control microbiológico ambiental en zonas de producción. Ed. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Madrid.
- (5) ANÓNIMO. 1997. Real Farmacopea Española. 1ª Edic. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

- (6) BANKS, J.G., BOARD, R.G., CARTER, J. and DODGE, A.D. 1985. *Journal of Applied Bacteriology*, **58**, 391-400.
- (7) BARNETT, H.L. and HUNTER, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. Burgess publishing company, Minneapolis.
- (8) BARNETT, H.L.; PAYNE, R.W. and YARROW, D. 1983. Yeasts: Characteristics and identification. Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- (9) BARROW, G.I and FELTHAM, R.K.A. 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- (10) BLOMQUIST, G.; STROM, G. and STROMQUIST, L.H. 1984. *Scandinavian Journal Work Environmental Health*, **10**, 109-113.
- (11) BUTTNER, M.P. and STETZENBACH, L. 1993. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 219-226.
- (12) BUTTNER, M.P.; WILLEKE, K. and GRINSHHPUN, S.A. 1997. Sampling and analysis of airborne microorganisms. En: Hurst, C. *et al* (ed). Manual of environmental microbiology. Ed. ASM Press, Washington.
- (13) EDUARD, W.; LACEY, J.; KARLSSON, K.; PALMGREN, U.; STROM, G. and BLOMQUIST, G. 1990. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **51**, 427-436.
- (14) FAVERO, M.S.; PULEO, J.R.; MARSHALL, J.H. and OXBORROW, G. 1966. *Applied Microbiology*, **14**, 539-551.
- (15) HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- (16) JUOZAITIS, A.; WILLEKE, K.; GRINSHHPUN, S.A. and DONNELLY, J. 1994. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 861-870.
- (17) KAYE, S. 1988. *Journal of Parenteral Science and Technology*, **5**, 147-152.
- (18) KONEMAN, E and ROBERTS, G. 1987. *Micología práctica de laboratorio*. 3ª Edic. Ed. Panamericana, Argentina.
- (19) KRIEG, R.N. and HOLT, G.J. 1984. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol. I. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- (20) LEVETIN, E. 1991. *Grana* **30**, 123-128.
- (21) LJUNGQVIST, B. and REINMÜLLER, B. 1998. *European Journal of Parenteral Sciences*, **3**, 59-62.
- (22) MARTIN, J.P. 1950. *Soil Science*, **69**, 215-232.

- (23) MATHEWS, M.M. and SISTROM, W.R. 1959. *Nature*, **184**, 1892-1895.
- (24) MIQUEL, P. et CAMBERT, R. 1901. *Traité de bacteriologie pure et appliqueé*. Ed. Masson y Cia., París.
- (25) MOHR, A.J. 1997. Fate and transport of microorganisms in air. En: Hurst, C. *et al* (ed). *Manual of environmental microbiology*. Ed. ASM Press, Washington.
- (26) ONIONS, H.S.A.; ALLSOPP, D. and EGGINS, H.O. 1981. *Smith's introduction to industrial Microbiology*. 7ª Edic. Ed. Edward Arnold, London.
- (27) PASCUAL, P. 1989. *Estudio técnico-práctico para la cualificación y validación de sistemas y procesos en áreas estériles*. Monografía. Ed. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Madrid.
- (28) SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E and HOLT, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol II. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- (29) STEWART, S.L.; GRINSHPUN, S.A.; WILLEKE, K.; TERZIEVA, S.; ULEVICIUS, V. and DONNELLY, J. 1995. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1232-1239.
- (30) UNDERWOOD, E. 1992. Ecology of microorganims as it affects the pharmaceutical industry. En: Hugo, W.B. and Russell, A.D. (ed.) *Pharmaceutical microbiology*. 5ª Edic. Ed. Blackwell Scientific Publication, London.
- (31) WELLS, W. F. 1933. *American Journal of Public Health*, **23**, 58-99.
- (32) YANG, CH. and JOHANNING, E. 1997. Airborne fungi and mycotoxins. En: Hurst, C.J. *et al.* (ed). *Manual of environmental microbiology*. Ed. ASM. Washington.