



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA  
Y BIOQUÍMICA**

**VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO  
DEL MONITOREO DE SUPERFICIE POR HISOPADO EN LA  
INDUSTRIA FARMACÉUTICA.**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

**Br.: Díaz Fernández, Martha María**

Asesora: Mg Q.F. Blgo. Ana María Chávez Fernández

Lima-Perú

2018

## **AGRADECIMIENTO:**

A todas aquellas personas que me brindaron su paciencia, comprensión, apoyo incondicional, su asesoramiento académico y la oportunidad de recurrir a su experiencia para la culminación de mi tesis.

## RESUMEN

El presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar los diferentes métodos de monitoreo de superficies realizados en la industria farmacéutica 2016 – 2017. Se efectuó un estudio de Campo, Descriptiva – Longitudinal, Cualitativa y Aplicada. Para ello se evaluó los parámetros según La farmacopea de los Estados Unidos (USP 40 NF 35) <1223>Validación de Métodos microbiológicos alternativos, se eligió microorganismos similares a los eventualmente encontrados (Estándar biológicos) en los procesos de manufactura de los productos farmacéuticos, se evaluó el material de trabajo, se definió los niveles de detección y se aplicó a los diferentes métodos de monitoreo superficie en evaluación. Se observa que si bien los métodos no presentan resultados homogéneos; Se considera el método que presenta mayor porcentaje (%) de recobro, en más de una ATCC. Es el método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona. ATCC 9027(15.30%); ATCC 6538 (41%) y ATCC 8739(17.4%).

Es por ello que el presente estudio permite conocer la importancia de identificar y evaluar los métodos propuestos para la industria farmacéutica, la cual siempre está en constante mejora e innovando en métodos para la agilizar resultados. La finalidad es evitar los falsos positivos o negativos y garantizar la calidad e inocuidad de los productos farmacéuticos.

**Palabras Claves:** Validación, Método de Monitoreo Superficie, Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado.

## SUMMARY

The present study was carried out with the purpose of evaluating the different methods of surface monitoring carried out in the pharmaceutical industry 2016 - 2017. A Field, Descriptive - Longitudinal, Qualitative and Applied study was carried out. To this end, the parameters were evaluated according to the United States Pharmacopoeia (USP 40 NF 35) <1223> Validation of alternative microbiological methods, microorganisms similar to those found were selected (biological standard) in the manufacturing processes of pharmaceutical products, it was evaluated that the working material, the levels of detection were defined and applied to the different methods of surface monitoring in evaluation. It is observed that although the methods do not present homogeneous results; It is considered the method that presents the highest percentage (%) of recovery, in more than one ATCC. It is the Regular Hyssop method of Plastic Soft Nylon Point Sterile Flocked + Shock absorber Solution Sodium Chloride - Peptone. ATCC 9027 (15.30%); ATCC 6538 (41%) and ATCC 8739 (17.4%).

That is why this study us to know the importance of importance of identifying and evaluating the proposed methods for the pharmaceutical industry, which is always in constant improvement and innovating in methods to streamline results. The purpose is to avoid false positives or negatives and to guarantee the quality and safety of pharmaceutical products.

**Key Words:** Validation, Surface Monitoring Method, Regular Plastic Swab Soft Sterile Nylon Tip Flocked.

## ÍNDICE DE CONTENIDO:

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Planteamiento del problema.....	3
1.2.	Justificación.....	3
1.2.1.	Aspecto salud.....	3
1.2.2.	Aspecto metodológico.....	3
1.2.3.	Aspecto procedimental.....	3
1.3.	Objetivos.....	3
1.3.1.	Objetivo general.....	3
1.3.2.	Objetivos específicos.....	3
II.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.	Antecedentes.....	5
2.1.1.	Nacionales.....	5
2.1.2.	Internacionales.....	6
2.2.	Bases Legales.....	8
2.2.1.	Internacionales.....	8
2.2.2.	Nacionales.....	8
2.3.	Bases Teóricas.....	10
2.3.1.	Áreas limpias de producción.....	10
2.3.2.	Clasificación.....	10
2.3.2.1.	Según la Organización Internacional para la Normalización (ISO).....	10
2.3.2.2.	Según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Farmacéuticos (AEMPS).....	11
2.4.	Agentes Químicos utilizados en la industria farmacéutica.....	12
2.4.1.	Clasificación.....	12
2.4.1.1.	Agente Esporicida.....	12
2.4.1.2.	Agente Sanitizante.....	12
2.4.1.3.	Agente Desinfectante.....	12
2.4.1.4.	Desinfectante Químico.....	12
2.4.2.	Eficacia.....	13
2.4.3.	Agentes Químicos más utilizados.....	13
2.4.3.1.	Alcoholes.....	13

2.4.3.2. Glutaraldehido.....	13
2.4.3.3. Halógenos.....	14
2.4.3.4. Amonios cuaternarios.....	14
2.5. Métodos microbiológicos – toma de muestra.....	15
2.5.1. Muestreo de microorganismos del aire.....	15
2.5.1.1. Clasificación.....	15
a. Muestreador de Aire de Ranura-Agar (STA).....	15
b. Impactador de Tamiz.....	16
c. Placas de Sedimentación.....	16
2.5.2. Muestreo de Superficie.....	17
2.5.2.1. Clasificación.....	17
a. Método del hisopado.....	17
b. Método de lavado y plaqueo.....	18
c. Método por placa rodac.....	19
2.6. Microorganismos de referencia, Medios de cultivo, Equipos y Materiales .....	20
2.6.1. Microorganismos de referencia.....	20
2.6.2. Microorganismos de trabajo.....	20
2.6.2.1. Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027).....	20
2.6.2.2. Staphylococcus aureus (ATCC 6538).....	21
2.6.2.3. Escherichia coli (ATCC 8739).....	22
2.7. Medios de cultivo.....	23
2.7.1. Características.....	23
a. Disponibilidad de nutrientes adecuados.....	23
b. Consistencia adecuada del medio.....	24
c. Presencia (o ausencia) de oxígenos y otros gases.....	24
d. Condiciones                    adecuadas                    de humedad.....	24
e. Luz ambiental.....	25
f. pH.....	25
g. Esterilidad del medio.....	25

2.7.2. Clasificación.....	25
2.7.2.1. Según su consistencia.....	25
a. Medios líquidos.....	25
b. Medios sólidos.....	26
c. Medios semisólidos.....	26
2.7.2.2. Según su utilización.....	26
a. Medios comunes.....	26
b. Medios de enriquecimiento.....	26
c. Medios selectivos.....	26
d. Medios diferenciales.....	27
e. Medios de transporte.....	27
2.7.2.3. Según su composición.....	27
a. Medios complejos o indefinidos.....	27
b. Medios sintéticos o definidos.....	27
2.7.2.4. Según su origen.....	28
a. Naturales.....	28
b. Sintéticos.....	28
c. Semisintéticos.....	28
2.7.3. Preparación de medios de cultivo.....	28
2.7.3.1. Medio líquido.....	28
a. Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona de pH 7,0 (AP).....	28
b. Peptona Lecitina Polisorbato (CPLP).....	29
2.7.3.2. Medio sólido.....	30
a. Agar Digerido de Caseína y Soja (TSA).....	30
b. Agar Mac Conkey (MC).....	31
c. Cetrimide Agar Base (CET).....	32
d. Manitol Salado Agar (MAN).....	33
2.7.4. Pruebas de control requeridas.....	34
2.7.4.1. Promoción de crecimiento.....	34
2.8. Equipos y materiales de laboratorio.....	35
2.8.1. Equipos de laboratorio.....	35

2.8.1.1.	Cabina de seguridad biológica o de Bioseguridad.....	35
2.8.1.2.	Balanza analítica.....	36
2.8.1.3.	Autoclave automática.....	37
2.8.1.4.	Incubadora.....	37
2.8.1.5.	Micropipeta.....	38
2.8.2.	Materiales de laboratorio.....	38
2.8.2.1.	Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado y soluciones acompañantes.....	38
2.8.2.2.	Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado.....	38
2.8.2.3.	Hisopo Aplicador con punta de Algodón.....	39
2.9.	Validación.....	39
2.9.1.	Tipos de validación.....	40
2.9.2.	Parámetros de validación.....	41
2.9.2.1.	Especificidad.....	41
2.9.2.2.	Límite de detección.....	41
2.9.2.3.	Robustez.....	41
2.9.2.4.	Tolerancia.....	42
2.9.2.5.	Exactitud.....	42
2.9.2.6.	Precisión.....	42
2.9.2.7.	Límite de cuantificación.....	42
2.9.2.8.	Linealidad.....	43
III.	HIPÓTESIS.....	44
3.1.	Hipótesis general.....	44
3.2.	Variables.....	44
3.2.1.	Variable independiente.....	44
3.2.2.	Variable dependiente.....	44
IV.	METODOLOGÍA DEL ESTUDIO .....	44
4.1.	Tipo de estudio.....	44
4.1.1.	Según estrategia aplicada.....	44
4.1.2.	Según el nivel y alcance.....	44

4.1.3. Según tendencia o enfoque.....	44
4.1.4. Según el propósito u orientación.....	44
4.1.5. Diseño de investigación.....	44
4.2. Población de estudio.....	44
4.3. Criterios de selección.....	45
4.4. Métodos de análisis de datos.....	45
V. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA.....	46
5.1. Estandarización de Inóculo.....	46
5.2. Promoción de crecimiento e inhibitorio de los medios.....	48
5.3. Preparación de medios de cultivo.....	49
5.3.1. Preparación de Medios Líquidos.....	49
5.3.2. Preparación de Medios de Cultivo – Sólidos.....	50
5.4. Esterilización.....	51
5.5. Métodos de monitoreo de superficie por hisopado.....	52
5.5.1. Método Hisopo Aplicador con punta de Algodón + Caldo Peptona Lecitina Polisobarto.....	52
5.5.2. Método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon Estéril Floqueado y soluciones acompañantes.....	53
5.5.3. Método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona.....	54
5.5.4. Método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato.....	55
VI. RESULTADOS.....	56
6.1. Parámetros evaluados en la validación del método analítico de monitoreo de superficies por hisopado en la Industria Farmacéutica.....	64
6.1.1. Exactitud.....	64
6.1.2. Precisión.....	65
6.1.3. Selectividad.....	65
6.1.4. Robustez.....	65
6.1.5. Linealidad.....	65

6.1.6. Límite de detección.....	66
6.1.7. Límite de cuantificación.....	66
VII. DISCUSIÓN.....	67
VIII. CONCLUSIONES.....	70
IX. RECOMENDACIONES.....	72
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
XI. ANEXOS.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla N° 1:	Clasificación de áreas y Límites requeridos para monitoreo microbiológicos .....	11
Tabla N° 2:	Clasificación General de Antisépticos, Desinfectantes y Agentes Esporicidas.....	12
Tabla N° 3:	Mecanismo de la Actividad de los Desinfectantes Contra Células Microbianas.....	14
Tabla N° 4:	Tipos de hisopos utilizados en la industria farmacéutica.....	18
Tabla N° 5:	Microorganismos de referencia según farmacopea.....	20
Tabla N° 6:	Parámetros de Validación por Tipo de Prueba Microbiológica.....	43
Tabla N° 7:	Promoción del crecimiento medios no selectivos.....	48
Tabla N° 8:	Promoción del crecimiento medios selectivos.....	49
Tabla N° 9:	Porcentaje (%) recobro - Hisopo Aplicador con punta de Algodón Estéril + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato	56
Tabla N° 10:	Porcentaje (%) recobro - Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Soluciones acompañantes.....	57
Tabla N° 11:	Porcentaje (%) recobro - Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Cloruro de sodio – Peptona.....	58
Tabla N° 12:	Porcentaje (%) recobro – Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato.....	59
Tabla N° 13:	Resultados por porcentaje de recobro – métodos analíticos de monitoreo de superficie.....	62
Tabla N° 14:	Parámetros de validación – método analítico con mayor porcentaje(%) recobro.....	64
Tabla N° 15:	Parámetros de validación – Resultado de precisión.....	65

## ÍNDICE DE GRÁFICO:

Gráfico N° 1:	Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Aplicador con punta de Algodón Estéril Caldo Peptona Lecitina Polisorbato.....	60
Gráfico N° 2:	Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Soluciones acompañantes.....	60
Gráfico N° 3:	Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona.....	61
Gráfico N° 4:	Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado +Caldo Peptona Lecitina Polisorbato.....	61
Gráfico N° 5:	Resultados por porcentaje de recobro – métodos analíticos de monitoreo de superficie.....	63
Gráfico N° 6:	Resultado de exactitud .....	62

## ÍNDICE DE FLUJOGRAMA:

Flujograma N° 1:	Estandarización del inóculo.....	47
------------------	----------------------------------	----

## I. INTRODUCCIÓN

Los controles microbiológicos en la industria farmacéutica constituyen exigencias que permiten conocer la carga microbiana real de las distintas áreas en donde se fabrica, envasa y acondiciona el producto farmacéutico, varían dependiendo la clasificación del área, la calidad de los productos farmacéuticos, tal que sean seguros para la población.

Existen muchos métodos para el monitoreo de superficie en las áreas de fabricación de la industria farmacéutica y de la industria de alimentos. Los métodos utilizados en la industria farmacéutica permitieron el control de los procesos de limpieza; en la actualidad, los fabricantes de insumos y materiales para la industria farmacéutica han poblado el mercado Genlab <sup>(1)</sup>, permitiendo cumplir con las exigencias de la Autoridad Sanitaria y los requerimientos planteados en las obras oficiales de referencia (como ejemplo. Farmacopea – Estados Unidos USP 40 NF 35) 1116<CONTROLES MICROBIOLÓGICOS Y MONITOREO DE AMBIENTES DE PROCESAMIENTOS ASEPTICOS>. <sup>(2)</sup> Acorde al crecimiento de la industria farmacéutica en el Perú que exige contar con resultados confiables y certeros; garantizando la seguridad y control en cada etapa, hasta la obtención del producto farmacéutico.

En la Industria Farmacéutica se está iniciando el uso de métodos innovadores, entre los cuales se encuentran los denominados **kits** estériles de superficie, utilizados también en la industria de alimentos, como el hisopo regular de plástico punta de nylon suave estéril floqueado y soluciones acompañantes<sup>(1)</sup>, que permite la practicidad de uso y la obtención de resultados cuali – cuantitativos; Teniendo en cuenta, que cada método nuevo, debe ser probado a fin de confrontar la propia documentación de referencia y la exigencia del Laboratorio Farmacéutico.

Adicionalmente los parámetros deben ser reproducibles y tener un porcentaje (%) de recobro del crecimiento microbiano, además de características morfológicas similares a los establecidos por los organismos de colección microbiológica, garantizando una respuesta confiable (organismos de cultivo de referencia) como ejemplo: *American Type Culture Collection (ATCC)*.

La investigación se realizó en un laboratorio farmacéutico con el propósito de validar los métodos de monitoreo de superficie *Hisopo Aplicador con punta*

*de Algodón + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato, Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado y soluciones acompañantes , Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona e Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato.*

## **1.1. Planteamiento del problema**

¿Cuál es el método analítico de monitoreo de superficie por hisopado empleado en la industria farmacéutica con mayor porcentaje (%) de recobro, tal que permita su posterior validación e implementación?

## **1.2. Justificación**

### **1.2.1. Aspecto salud**

- Minimizar las posibles causas de contaminación microbiana en los procesos de elaboración de los productos farmacéuticos.
- Garantizar productos inocuos, de calidad que ayuden a la salud de la población peruana.

### **1.2.2. Aspecto metodológico**

- Validar el primer método analítico microbiológico en el Laboratorio Farmacéutico.
- Validar un método analítico capaz de tener un recobro  $\leq$  50% de Unidades formadoras de colonia (UFC), frente a un estándar de referencia Cepa ATCC.

### **1.2.3. Aspecto procedimental**

- Implementar el procedimiento para el Monitoreo de superficie por Hisopado en el Laboratorio Farmacéutico.
- Capacitar al personal en el procedimiento para el Monitoreo de superficie por Hisopado en el Laboratorio Farmacéutico.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

- Validar el método analítico de monitoreo de superficie por hisopado en el industria farmacéutica con mayor porcentaje (%) de recobro.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Determinar el porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Aplicador con punta de Algodón + Caldo Peptona Lecitina

Polisorbato, tal que permita su posterior validación en la industria farmacéutica.

- Determinar el porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado y soluciones acompañantes, tal que permita su posterior validación en la industria farmacéutica.
- Determinar el porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona, tal que permita su posterior validación en la industria farmacéutica.
- Determinar el porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato, tal que permita su posterior validación en la industria farmacéutica.
- Determinar el porcentaje de recobro de cada uno de los métodos analíticos de monitoreo de superficie Hisopo Aplicador con punta de Algodón + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato, Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado y soluciones acompañantes, Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona e Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato.
- Determinar el método analítico por hisopado con mayor porcentaje (%) de recobro.
- Definir los parámetros de validación del método analítico con mayor porcentaje (%) de recobro, según la obra oficial Vigente. (Farmacopea – Estados Unidos USP 40 NF 35).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

#### 2.1.1. Nacionales

- H. Enrique Medina Reyna, W. Alfredo Jara Torres; Validación de un sistema de tratamiento de agua grado inyectable.

Medina, H., en su estudio sobre Validación de un sistema de tratamiento de agua grado inyectable. Evalúa todos los sistemas y parámetros que aplican al agua grado inyectable (pH, conductividad, metales pesados y recuento microbiano) por un tiempo determinado y mediante resultados estadísticos resuelve la conformidad del proceso en conjunto para la elaboración de sus productos inyectables. (3)

- Dirección General Medicamentos, Insumo y Drogas (Digemid)-Perú, reporta no conformidades procedentes de análisis de control de calidad, de muestras pesquisadas a empresas farmacéuticas cuyos resultados adversos referidos a pruebas microbiológicas se han dado según como sigue:

Solución Concentrada Básica Para Hemodiálisis (Galón x 4000 mL) Lote: 006516, NG-2491 Laboratorios PER S.A.C – PERU, No conforme para los ensayos de Contaminación Microbiana (2007). (4)

- Dirección General Medicamentos, Insumo y Drogas (Digemid)-Perú -Digemid N°04-2018, Hibiclen A.V Espuma 2% Laboratorios Roker Perú S.A, No conforme ensayos de limite microbiano. (5)

#### 2.1.2. Internacionales

- C. Gutiérrez Arcila; Validación del proceso de limpieza y sanitización de un área de envase de producción de vacunas biológicas.

Gutiérrez, C., en su estudio de validación del proceso de limpieza y sanitización de un área de envase de producción de vacunas biológicas, destaca los parámetros de una validación tanto en áreas como en equipos, relacionados al proceso de manufactura de vacunas biológicas, haciendo uso del método placas de contacto Petri film e Hisopos quick swap, con lo cual se confirma la importancia del método aludido para el logro de un proceso estandarizado y bajo control. (6)

- E. García Montoya; Pérez Lozano; Validación de los procesos de limpieza en la industria farmacéutica, mediante la aplicación del análisis de riesgo, seguridad toxicológica y UPLC.

García, E., en su estudio sobre Validación de los procesos de limpieza en la industria farmacéutica, mediante la aplicación del análisis de riesgo, seguridad toxicológica y UPLC, destaca los parámetros de una validación en las diferentes áreas, equipos. Controla las diversas contaminaciones presentes en los procesos de manufactura (química o microbiológica) mediante el análisis de trazas por el método de Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC), en las distintas formas farmacéuticas que se fabrican en las áreas de producción. (7)

- M. Laura Morales Henríquez; Validación del procedimiento de limpieza del proceso de manufactura de caramelos de laboratorios elmor, s.a.

Morales, M., en su estudio sobre Validación del procedimiento de limpieza del proceso de manufactura de caramelos de laboratorios elmor, s.a. determina por el método de Hisopado el porcentaje de residuo del activo Cloruro de cetilpiridinio en áreas de trabajo y equipos, mediante el análisis de trazas por el método de Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC), siendo este

su activo principal para la fabricación de sus caramelos masticables. <sup>(8)</sup>

- Delgado, M. Escamilla, L. Pérez, A. Arias, J. Determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos estériles a base de antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Delgado, M., en su Determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos estériles a base de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, evalúa los sistemas de apoyo por método microbiológicos; Sedimentación, hisopado y contacto de placas. Determinando los límites de confianza y aceptación, mediante resultados obtenidos en un tiempo determinado. <sup>(9)</sup>

- Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), reporta no conformidad IPM Herida Gel por Edwards productos Farmacéuticos: Contaminación Microbiana IPM Herida Gel Lote # 3P3446 distribuido por Edwards Pharmaceuticals Inc. La gran cantidad de MIP de la Herida Gel puede estar contaminada con bacterias (*Pseudomonas Putida*). <sup>(10)</sup>

- En julio de 1993 apareció en la guía de inspección de la FDA una revisión sobre la validación de limpieza. En ella se exigió que en las compañías se implementara procedimientos generales de los procesos de limpieza para su posterior validación, donde se debe especificar el procedimiento de muestreo y el método analítico usado en la cuantificación del residuo del producto en estudio.

<sup>(11)</sup>

*Los procesos de validación son etapas importantes y necesarias que deben cumplirse para garantizar la confiabilidad de un método, equipo, o proceso. Al realizar la validación lo que interesa es poner en evidencia que un*

método, equipo o proceso funcionan de acuerdo a lo esperado, todo esto en base a un estudio estadístico. <sup>(11)</sup>

## **2.2. Bases Legales**

### **2.2.1. Internacionales**

- Serie de Informes Técnicos No. 961 – Organización Mundial de la Salud (OMS) – 2011, Anexo 6, indica:  
*“El saneamiento de las áreas limpias es especialmente importante. Éstas deben desinfectarse frecuente y meticulosamente de acuerdo con un programa escrito aprobado. Donde se utilizan desinfectantes, se debe emplear más de un tipo. Se debe llevar a cabo un monitoreo periódico para detectar la contaminación o presencia de algún organismo contra el cual el procedimiento sanitario es ineficaz. Las interacciones entre los diferentes materiales de limpieza deben ser validadas. Se debe llevar a cabo la validación adecuada de la limpieza para garantizar la detección de residuos de desinfectantes y su eliminación mediante el proceso de higienización”.* <sup>(12)</sup>

### **2.2.2. Nacionales**

- Buenas prácticas de Manufactura (BPM) de Productos Farmacéuticos RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 055-99.SA/DM Febrero de 1999 Oficio N° 001-99-DG-DIGEMID, señala que los objetivos de las buenas prácticas de manufactura incluyen la prevención de posible contaminación y contaminación cruzada de materias primas y productos farmacéuticos.  
Donde indica: *“Los productos farmacéuticos pueden ser contaminados por una variedad de sustancias tales como contaminantes asociados con microorganismos, productos anteriores (ingredientes farmacéuticos activos (API) y residuos de excipientes), residuos de agentes de*

*limpieza, materiales suspendidos en el aire, tales como polvo y material particulado, lubricantes y materiales auxiliares, tales como desinfectantes y residuos de productos de descomposición”.*<sup>(13)</sup>

- RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 055-99.SA/DM Febrero de 1999 Visto el Oficio N° 001-99-DG-DIGEMID, relativo a la aprobación del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos:

Considerando: que las denominadas Buenas Prácticas de Manufactura constituyen un conjunto de normas mínimas para la correcta fabricación de productos Farmacéuticos, y establecen los estándares que deben ser observados por la industria farmacéutica para la fabricación de sus productos, de manera que puedan satisfacer los criterios de calidad requeridos, a fin de cautelar la salud de la población usuaria.<sup>(14)</sup>

La industria farmacéutica como un área de alto desarrollo se encuentra en constante investigación científica para desarrollar y elaborar productos de calidad. Para asegurar que un producto farmacéutico cuente con las condiciones aptas para el consumo humano, se exige que los equipos, *métodos analíticos*, procesos de fabricación y limpieza, se encuentren validados, previniendo de esta manera la contaminación cruzada o la adulteración de medicamentos.<sup>(14)</sup>

## **2.3. Bases Teóricas**

### **2.3.1. Áreas limpias de producción**

Ambientes microbiológicamente controlados se usan para diversos propósitos dentro de la industria de los cuidados de la salud. <sup>(2)</sup>

Un cuarto limpio es un ambiente controlado en el cual todo el aire, agua y químicos que entran son procesados para cumplir altos estándares de pureza. Además, del control de la temperatura, humedad y presión, el elemento clave es la filtración de aire, la cual se logra por el uso de filtros High Efficiency Particulate Air. (HEPA).

Este tipo de locales deben diseñarse, construirse, utilizarse y mantenerse de forma adecuada y conveniente a las operaciones que realicen en ellos. Las superficies interiores de los componentes constructivos (paredes, techos, suelos, pisos...) deben ser lisas, sin grietas ni fisuras. No deben liberar partículas ni servir como soporte al crecimiento microbiológico y su limpieza tiene que poder realizarse de forma fácil y efectiva y en caso necesario, ser aptas para su desinfección. Agentes desinfectantes de rotación por una posible resistencia. <sup>(15)</sup>

### **2.3.2. Clasificación**

**2.3.2.1.** Según la Organización Internacional para la Normalización (ISO), las áreas limpias se clasifican en:

- ISO Clase 8/Clase 100 000 están diseñados para proporcionar un mínimo de 20 cambios de aire por hora. <sup>(15)</sup>
- ISO Clase 7 /Clase 10 000 están diseñados para proporcionar más de 50 cambios de aire por hora. <sup>(15)</sup>
- ISO Clase 5/Clase 100 proporcionan más de 100 cambios de aire por hora. Los criterios para el diseño de algunas instalaciones puede diferir.

<sup>(15)</sup>

**2.3.2.2.** Según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Farmacéuticos (AEMPS):

- Grado A: Zona donde se realizan operaciones de alto riesgo tales como la zona de llenado, de bandejas de tapones, de ampollas y viales abiertos y de realización de conexiones asépticas. Normalmente estas condiciones son provistas por estaciones de trabajo de flujo laminar. Los sistemas de flujo laminar deben proporcionar una velocidad homogénea del aire en un intervalo de 0,36 – 0,54 m/s (valor orientativo) a nivel del punto de trabajo en entorno abierto. Debe demostrarse y validarse el mantenimiento de la laminaridad. Se puede utilizar un flujo de aire unidireccional y velocidades más bajas en aisladores cerrados y con guantes.<sup>(16)</sup>
- Grado B: Entorno para la zona de grado A en el caso de preparación y llenado asépticos.<sup>(16)</sup>
- Grados C y D: Zonas limpias para realizar fases menos críticas de la fabricación de productos estériles.<sup>(16)</sup>

**Tabla N° 1: Clasificación de áreas y Límites requeridos para monitoreo microbiológicos**

Grado	Límites recomendados de la contaminación microbiana (a)			
	muestra de aire ufc/m <sup>3</sup>	placas de sedimentación (diámetro 90 mm) ufc/4 horas (b)	placas de contacto (diámetro 55 mm) ufc/placa	impresión de guantes 5 dedos ufc/guante
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

**Fuentes: BPM, ISO y AEMPS.** (12, 15,16)

## 2.4. Agentes Químicos utilizados en la industria farmacéutica

### 2.4.1. Clasificación

#### 2.4.1.1. Agente Esporicida

Agente que destruye esporas fúngicas y bacterianas cuando se usa en una concentración suficiente durante un tiempo de contacto específico. Se espera que mate todo microorganismo vegetativo. <sup>(17)</sup>

#### 2.4.1.2. Agente Sanitizante

Agente que reduce, en superficies inanimadas, la cantidad de toda forma de vida microbiana, incluyendo hongos, virus y bacterias. <sup>(17)</sup>

#### 2.4.1.3. Agente Desinfectante

Agente físico o químico que al aplicarse sobre una superficie destruye o elimina formas vegetativas microorganismos nocivos. <sup>(17)</sup>

#### 2.4.1.4. Desinfectante Químico

Agente químico que se emplea en superficies y objetos inanimados para destruir virus, bacterias y hongos infecciosos, aunque no necesariamente sus esporas. Los agentes antivirales y esporicidas pueden considerarse como una clase especial de desinfectantes. <sup>(17)</sup>

**Tabla N° 2: Clasificación General de Antisépticos, Desinfectantes y Agentes Esporicidas.**

Entidad Química	Clasificación	Ejemplo
Aldehídos	Agente esporicida	Glutaraldehído al 2%
Alcoholes	Desinfectante de uso general, antiséptico y agente antiviral	Alcohol isopropílico al 70%, alcohol al 70%
Cloro e hipoclorito de sodio	Agente esporicida	Hipoclorito de sodio al 0,5%
Fenólicos	Desinfectante de uso general	500 µg por g de Clorocresol, 500 µg por g de cloroxileno
Ozono	Agente esporicida	8% de Gas en peso
Peróxido de hidrógeno	Esterilizante de fase vapor, agente esporicida líquido, antiséptico	4 µg por g de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vapor, solución del 10% al 25%, solución al 3%
Biguanidas sustituidas	Agente antiséptico	Gluconato de clorhexidina al 0,5%
Ácido peracético	Esterilizante líquido, esterilizante de fase vapor	Ácido peracético al 0,2%, 1 µg por g de ácido peracético
Óxido de etileno	Esterilizante de fase vapor	600 µg por g de Óxido de etileno
Compuestos de amonio cuaternario	Desinfectante de uso general y antiséptico	Concentración dependiente de la aplicación, Cloruro de benzalconio
β -Propiolactona	Agente esporicida	100 µg por g de β -Propiolactona

**Fuente: USP 40 NF 35 Capítulo <1072> Desinfectantes y Antisépticos. <sup>(17)</sup>**

### **2.4.2. Eficacia**

La actividad de un desinfectante biocida intrínseca depende, la concentración del desinfectante, el tiempo de contacto, la naturaleza de la superficie desinfectada, la dureza del agua usada para diluir el desinfectante, la cantidad de material orgánico presente en la superficie, y el tipo y la cantidad de microorganismos presentes. Conforme a la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act o FIFRA, por sus siglas en inglés), la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (EPA) registra los desinfectantes químicos que se comercializan en los Estados Unidos y exige que los fabricantes suministren información del producto en cuanto a la dilución de uso, el tipo de microorganismos que eliminan y el tiempo de contacto necesario. Ciertos esterilizantes químicos líquidos que se destinan al uso en dispositivos médicos críticos o semicríticos se encuentran definidos y regulados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA).<sup>(17)</sup>

### **2.4.3. Agentes Químicos más utilizados**

#### **2.4.3.1. Alcoholes**

Los alcoholes más usados son el etanol y el isopropanol, ambos se usan al 70 % dado que a esa concentración expresan su mayor poder desinfectante. Ejercen su acción dañando membranas celulares y desestabilizando proteínas.<sup>(18)</sup>

#### **2.4.3.2. Glutaraldehído**

Al igual que el agente anterior el Glutaraldehído ejerce su acción frente a diferentes grupos funcionales de macromoléculas, pero además al ser una molécula divalente (con dos grupos reactivos), tiene una fuerte unión a grupos amino de pared y membrana celular, e inhibe funciones como el

transporte de electrones. Sus dos funciones aldehído tienen la distancia óptima para producir entrecruzamiento en la cadena de DNA. <sup>(18)</sup>

### 2.4.3.3. Halógenos

En esta categoría ubicamos a agentes que generan cloro activo como: Hipoclorito de sodio, Dióxido de cloro, Dicloroisocianurato, CloraminaT, etc. En todos los casos, dado que actúan a través del cloro activo, son productos oxidantes que ejercen su efecto oxidando grupos funcionales de macromoléculas. Son agentes de alto nivel, con una multiplicidad de usos. <sup>(18)</sup>

### 2.4.3.4. Amonios cuaternarios

Es el grupo que más se desarrolló en los últimos años siendo los más utilizados en diversas aplicaciones. Su acción se ejerce en varias etapas, la primera es la adsorción a la pared bacteriana, luego reacciona con la membrana plasmática conduciendo a su desorganización, con la consecuente pérdida de solutos de bajo peso molecular; la acción prosigue con degradación de macromoléculas y lisis celular. <sup>(18)</sup>

**Tabla N° 3: Mecanismo de la Actividad de los Desinfectantes Contra Células Microbianas.**

Objetivo	Desinfectante
Pared celular	Formaldehído, hipoclorito y glutaraldehído
Membrana citoplasmática, acción sobre el potencial de membrana	Anilidas y hexaclorofeno
Enzimas de membrana, acción sobre la cadena de transporte de electrones	Hexaclorofeno
Acción sobre el ATP	Clorhexidina y óxido de etileno
Acción sobre enzimas con grupos -SH	Óxido de etileno, glutaraldehído, peróxido de hidrógeno, hipoclorito y yodo
Acción sobre la permeabilidad general de membrana	Alcoholes, clorhexidina y compuestos de amonio cuaternario
Contenido de las células, coagulación general	Clorhexidina, aldehídos y compuestos de amonio cuaternario
Ribosomas	Peróxido de hidrógeno
Ácidos nucleicos	Hipocloritos
Grupos tiol	Óxido de etileno, glutaraldehído, peróxido de hidrógeno e hipoclorito
Grupos amino	Óxido de etileno, glutaraldehído e hipoclorito
Oxidación general	Hipoclorito

**Fuente: USP 40 NF 35 Capítulo <1072> Desinfectantes y Antisépticos. <sup>(17)</sup>**

## **2.5. Métodos microbiológicos – toma de muestra**

### **2.5.1. Muestreo de microorganismos del aire**

El monitoreo ambiental es uno de los varios elementos clave requeridos para asegurar que un área de procesamiento aséptico se mantiene en un nivel de control adecuado. El monitoreo es un ejercicio cualitativo e, incluso en las aplicaciones más críticas como el procesamiento aséptico, las conclusiones relacionadas con la aceptabilidad del lote no deben ser formuladas basándose únicamente en los resultados del muestreo ambiental. Los ambientes esencialmente libres de operadores humanos por lo general presentan tasas iniciales de contaminación bajas y mantienen bajos niveles de contaminación microbiana. Los cuartos limpios de escala humana presentan un panorama muy distinto. Los estudios muestran de manera concluyente que los operadores, incluso con el empleo cuidadoso y correcto de vestimentas, desprenden continuamente microorganismos en el ambiente. Por consiguiente, no resulta razonable asumir que en todo momento se observarán muestras que no produzcan colonias, incluso en la zona crítica o en superficies críticas. <sup>(2)</sup>

#### **2.5.1.1. Clasificación**

##### **a. Muestreador de Aire de Ranura-Agar (STA, por sus siglas en inglés)**

La unidad está impulsada por una fuente acoplada de vacío controlable. La toma de aire se hace a través de una ranura estandarizada debajo de la cual se coloca una placa de Petri que gira lentamente y que contiene agar nutritivo. Las partículas en el aire que tienen una masa suficiente impactan la superficie del agar y permite el crecimiento de los organismos viables. A menudo se usa una

toma de aire remota para no alterar el flujo de aire unidireccional. <sup>(2)</sup>

**b. Impactador de Tamiz**

Este aparato consiste en un recipiente diseñado para alojar una placa de Petri con agar nutritivo. La cubierta de la unidad está perforada con aberturas de un tamaño predeterminado. Una bomba de vacío toma un volumen conocido de aire a través de la cubierta y las partículas del aire que contienen microorganismos impactan el medio de agar de la placa de Petri. Algunos muestreadores disponen de una serie de tamices en cascada, con perforaciones de tamaño decreciente. Estas unidades permiten determinar la distribución del intervalo de tamaños de partículas que contienen microorganismos viables, basándose en el tamaño de las perforaciones que atraviesan las partículas para aterrizar en las placas de agar. <sup>(2)</sup>

**c. Placas de Sedimentación**

Este método aún se utiliza ampliamente como una manera simple y económica de evaluar cualitativamente los ambientes durante tiempos de exposición prolongados. Los datos publicados indican que las placas de sedimentación, al exponerlas durante periodos de 4 a 5 horas, pueden proveer un límite de detección para una evaluación adecuada del ambiente aséptico. Las placas de sedimentación pueden ser particularmente útiles en áreas críticas en las que el muestreo puede ser intrusivo y representar un riesgo para la operación aséptica. <sup>(2)</sup>

## **2.5.2. Muestreo de Superficie**

Otro componente del programa de control microbiano en ambientes controlados es el muestreo de las superficies de equipo, instalaciones y personal. La estandarización de los métodos y procedimientos para muestreo de superficies no ha sido tratada de manera tan amplia en la industria farmacéutica como la estandarización de los procedimientos para muestreo del aire. El muestreo de superficies puede llevarse a cabo mediante placas de contacto o por el método de hisopado. <sup>(2)</sup>

### **2.5.2.1. Clasificación**

#### **a. Método de hisopado**

Este método es elegido cuando se tienen superficies a muestrear irregulares. El hisopo una vez pasado por la superficie, es colocado en un apropiado diluyente y la estimación de microorganismos es realizada por plaqueo de una alícuota en agar nutritivo. La superficie a muestrear es previamente establecida. Generalmente se muestrean superficies de entre 25 a 30 cm<sup>2</sup>. Los hisopos pueden ser de distintos materiales, tales como algodón, dacrón, alginato de calcio, etc. Los mangos son generalmente plásticos ya que en la industria farmacéutica se busca evitar el uso de mangos de madera. Existen también kits comerciales que proveen un hisopo que se pasa por la superficie a controlar y luego es introducido en un blíster dejando que entre en contacto con el gel reactivo. Una vez realizada esta operación, se introduce dentro de una incubadora durante aproximadamente 16 horas y se comprueba la presencia o ausencia de microorganismos observando el cambio de color de la sustancia.

Existen distintos tipos de kits de control microbiológico: Generales, que detectan ausencia o presencia de microorganismos y Específicos para la detección de determinados microorganismos tales como estafilococos, coliformes, salmonella, etc. <sup>(18)</sup>

**Tabla N° 4: Tipos de hisopos utilizados en la industria farmacéutica.**

Tipo de hisopo	Características	Ventajas	Desventajas
Algodón	Es una forma pura de celulosa de alta cristalinidad. Es la fibra de la semilla el algodón.	Flexible, no acumula electricidad estática. Tiene alta resistencia al rasgado y al frote, gran poder absorbente.	Desprende partículas.
Rayón	Su materia prima es la celulosa de la madera del abeto, la cual se mezcla con ácidos como nítrico o sulfúrico.	-Absorción de la humedad -Estabilidad -Tacto sedoso	Baja resistencia en húmedo, arden con facilidad, se cargan de electricidad estática.
Dacrón	El Politereftalato de etileno es un polímero que se obtiene mediante una reacción de policondensación.	Resistente. Fácil de teñir, secado rápido, resistente a la mayoría de los productos químicos, al abrasión.	Su gran densidad encarece su coste.

**Fuente: Manual de microbiología aplicada a la industria farmacéutica cosmética y de productos médicos.** <sup>(18)</sup>

#### **b. Método de lavado y plaqueo**

Este método permite la toma de muestras de gran superficie, de zonas que son inaccesibles o que no pueden ser desmontadas rutinariamente. Las muestras de enjuague pueden entregar evidencia suficiente de una limpieza adecuada cuando la accesibilidad a las piezas de los equipos impide el muestreo directo de la superficie. Puede ser útil para verificar la eliminación de residuos de los agentes de limpieza o la presencia de contaminación microbiana. <sup>(18)</sup>

El método consiste en hacer pasar un diluyente, como por ejemplo, agua peptonada al 0.1% por la superficie a controlar. Tomar una alícuota de ese diluyente y sembrarlo en placas de Petri, incubando un juego de placas a temperatura de proliferación de bacterias y otro juego a temperatura de crecimiento de hongos. También puede ocurrir que en lugar de plaquear una alícuota de enjuague se haga pasar un volumen importante de diluyente por una membrana filtrante y sea esta membrana la que se incube en los medios y a las temperaturas adecuadas. <sup>(18)</sup>

**c. Método por placa rodac**

El uso de placas de contacto conteniendo nutrientes es elegido cuando las superficies a controlar son superficies regulares. Se realiza una presión controlada del agar de la placa sobre la superficie y esa misma placa se incuba por un tiempo y temperatura controlada. Las placas pueden usarse con distintos medios de cultivo, dependiendo la elección del tipo de control que se busque realizar. Las placas pueden comprarse listas para usar o agregarles el medio bajo condiciones asépticas en el lugar de uso. El medio de cultivo puede ser preparado en el lugar de uso o es posible comprar kits comerciales que traen viales de distintos medios estériles dosificado para llenar una placa o varias según le convenga al usuario. <sup>(18)</sup>

## 2.6. Microorganismos de referencia, Medios de cultivo, Equipos y Materiales

### 2.6.1. Microorganismos de referencia

También denominadas cepas de microorganismos control que constituyen “estándar biológico”. Estos microorganismos normalmente serán los necesarios para la comprobación de los métodos de control de productos. <sup>(19)</sup>

**Tabla N° 5: Microorganismos de referencia según farmacopea.**

<i>Staphylococcus aureus</i>	Por ejemplo ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 o NBRC 13276
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Por ejemplo ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 o NBRC 13275
<i>Escherichia coli</i>	Por ejemplo ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 o NBRC 3972
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium o, como alternativa,	Por ejemplo ATCC 14028
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar Abony	Por ejemplo NBRC 100797, NCTC 6017 o CIP 80.39
<i>Candida albicans</i>	Por ejemplo ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 o NBRC 1594

**Fuente: Manual de microbiología aplicada a la industria farmacéutica cosmética y de productos médicos. <sup>(19)</sup>**

La denominación de American Type Culture Collection (**ATCC**); Organización que se encarga: depósito, conservación, suministro e identificación. Citada según lo descrito en La farmacopea de Estados Unidos (USP 40 NF 35); También la colección española de cultivo tipo (CECT); Universidad de Valencia. <sup>(19)</sup>

### 2.6.2. Microorganismos de trabajo

#### 2.6.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

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. 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. 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.<sup>(19)</sup> 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.<sup>(19)</sup>

#### **2.6.2.2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)**

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. <sup>(19)</sup>

### **2.6.2.3. *Escherichia coli* (ATCC 8739)**

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. <sup>(19)</sup>

## **2.7. Medios de cultivo**

Es aquella solución 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. <sup>(20)</sup>

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. <sup>(20)</sup>

### **2.7.1. Características**

#### **a. 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. <sup>(18)</sup>

Muy a menudo se añaden al medio de cultivo ciertos colorantes, bien como indicadores de ciertas actividades metabólicas o bien por sus capacidades de actuar como inhibidores selectivos de ciertos microorganismos. <sup>(18)</sup>

**b. Consistencia adecuada del medio**

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. <sup>(18)</sup>

**c. 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 se 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 los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones. <sup>(18)</sup>

**d. 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 a 35-37°C cuando sea necesario que mantenga la humedad

necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseque el medio. <sup>(18)</sup>

**e. 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. <sup>(18)</sup>

**f. 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. <sup>(18)</sup>

**g. 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. <sup>(18)</sup>

**2.7.2. Clasificación**

**2.7.2.1. Según su consistencia**

**a. Medios líquidos**

Como se presentan en ese estado son llamados también caldos. <sup>(18)</sup>

**b. 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. <sup>(18)</sup>

**c. 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. <sup>(18)</sup>

**2.7.2.2. Según su utilización**

**a. 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. <sup>(18)</sup>

**b. 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. <sup>(18)</sup>

**c. 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 MacConkey posee sales biliares y cristal

violeta que inhiben las bacterias gram positivas.<sup>(18)</sup>

**d. 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.<sup>(18)</sup>

**e. 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.<sup>(18)</sup>

**2.7.2.3. Según su composición**

**a. 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.<sup>(18)</sup>

**b. 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.<sup>(18)</sup>

#### **2.7.2.4. Según su origen**

##### **a. Naturales**

Son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal. <sup>(18)</sup>

##### **b. Sintéticos**

Son los que contienen una composición química cuali y cuantitativamente definida.

Se utilizan para obtener resultados reproducibles. <sup>(18)</sup>

##### **c. Semisintéticos**

Son los medios sintéticos a los cuales se les agregan factores de crecimiento bajo una forma de extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura. <sup>(18)</sup>

#### **2.7.3. Preparación de medios de cultivo**

##### **2.7.3.1. Medio líquido**

##### **a. Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona de pH 7,0 (AP) <sup>(20)</sup>**

###### Fundamento:

El agua Peptonada Bufferada mantiene un pH alto durante el periodo de preenriquecimiento y anula los efectos del daño celular que puedan ocurrir a pH ácido. Esto es particularmente importante en las muestras de vegetales que tienen una baja capacidad reguladora. También puede ser utilizado para evaluar alimentos de aves de corral. En el medio de cultivo; la peptona es la fuente de Carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El cloruro de sodio el balance osmótico y los fosfatos forman un sistema buffer que regulan el pH del medio.

Composición:

Fosfato Monobásico de Potasio .....3,6 g  
Fosfato Bibásico de sodio Dihidrato  
(Equivalente a 0,067 M) .....7,2 g  
Cloruro de Sodio .....4,3 g  
Peptona de Carne o Caseína .....1,0 g

Preparación:

Pesar 1g de AP, por 1000 ml de agua purificada dispensar en frascos de vidrio pírrex según el volumen de uso (90 ml, 400 ml). Esterilización a 121°C por 15 minutos. Rango de pH: 7,0 ± 0,2. Ajustar de ser necesario con HCl 1N o NaOH 1N.

**b. Peptona Lecitina Polisorbato (CPLP) <sup>(21)</sup>**

Medio de dilución, para realizar el control higiénico de productos no obligatoriamente estériles.

Fundamento:

Este medio tiene la propiedad de neutralizar desinfectantes, debido a la presencia de lecitina de soja que neutraliza compuestos de amonio cuaternario y el agregado de polisorbato20 (Tween 20) que es útil para neutralizar compuestos tales como fenol, formalina, hexaclorofeno. La combinación de la lecitina con el tween permite neutralizar etanol.

Composición:

Digerido Pancreático de Caseína .....50,0 g  
Lecitina de Soja .....5,0 g

Preparación:

Pesar 25,0 g de CPLP, por 960 ml de agua purificada, agregar 40 ml de polisorbato 20 (Tween 20). Dejar reposar por 5 minutos dispensar en frascos de vidrio pyrex según el volumen de uso (200 ml). Esterilización a 121°C por 15 minutos. Rango de pH: 7,0 ± 0,2. Ajustar de ser necesario con HCl 1N o NaOH 1N.

**2.7.3.2. Medio sólido**

**a. Agar Digerido de Caseína y Soja (TSA) <sup>(22)</sup>**

Fundamento:

Contiene 2 peptonas ricas en fuentes de nitrógeno, obtenidas por la hidrólisis enzimática de Caseína y Soja, este medio soporta el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, incluyendo los exigentes aerobios y anaerobios. La Peptona de soja contiene azúcares naturales que promocionan el crecimiento bacteriano. El Cloruro sódico mantiene el balance osmótico.

Composición:

Digerido Pancreático de Caseína .....15,0 g  
Digerido Pancreático de Soja .....5,0 g  
Cloruro de Sodio .....5,0 g  
Peptona de Carne o Caseína .....15,0 g

Preparación:

Pesar 40 g de TSA, por 1000 ml de agua purificada dispensar en frascos de vidrio pyrex según el volumen de uso. Esterilización a 121°C por 15 minutos. Rango de pH: 7,3 ± 0,2.

Ajustar de ser necesario con HCl 1N o NaOH 1N.

**b. Agar Mac Conkey (MC) <sup>(23)</sup>**

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo.

Fundamento:

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Composición:

Peptona.....	50,0 g
Pluripeptona .....	10,0 g
Lactosa .....	10,0 g
Mezcla de Sales Biliares .....	1,5 g
Cloruro de Sodio .....	5,0 g
Agar.....	13,5 g
Rojo neutro.....	0,03 g

Preparación:

Pesar 50,0 g de MC, por 1000 mL de agua purificada, agrega. Dejar reposar por 5 minutos dispensar en frascos de vidrio pyrex según el volumen de uso (500 mL). Esterilización a 121°C por 15 minutos. Rango de pH: 7,1 ± 0,2. Ajustar de ser necesario con HCl 1N o NaOH 1N.

**c. Cetrimide Agar Base (CET) <sup>(24)</sup>**

La fórmula de este medio está desarrollada para favorecer la selección de *P. aeruginosa* y estimular la formación de pigmentos. Es éste un medio muy semejante al King A, en el cual el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina y piomelanina de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*.

Fundamento:

Su formulación permite el crecimiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos. En el cual la peptona de gelatina aporta los nutrientes para el desarrollo microbiano. El cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante.

Composición:

Peptona de gelatina.....	20,0 g
Cloruro de magnesio.....	1,4 g
Sulfato de potasio .....	10,0 g
Agar .....	13,6 g
Cetrimida .....	0,3 g

Preparación:

Pesar 45,3 g de CET, adicionar 10 ml de glicerol por 1000 ml de agua purificada, agrega. Dejar reposar por 5 minutos dispensar en frascos de vidrio pyrex según el volumen de uso (500 ml). Esterilización a 121°C por 15 minutos. Rango de pH: 7,2 ± 0,2. Ajustar de ser necesario con HCl 1N o NaOH 1N.

**d. Manitol Salado Agar (MAN) <sup>(25)</sup>**

Medio de Cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de diversas muestras.

Fundamento:

En el medio de cultivo, el extracto de carne, la peptona de carne y la tripteina, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales que promueven el desarrollo microbiano. El manitol es el hidrato de carbono fermentable. El cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, el rojo fenol es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que modifica el pH del

medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

Composición:

Extracto de carne.....	1,0 g
Peptona de carne.....	5,0 g
Tripteina .....	5,0 g
Manitol .....	10,0 g
Cloruro de Sodio .....	75,0 g
Rojo de fenol.....	0,025 g
Agar .....	15,0 g

Preparación:

Pesar 108,0 g de MAN, por 1000 ml de agua purificada. Dejar reposar por 5 minutos dispensar en frascos de vidrio pyrex según el volumen de uso (500 ml). Esterilización a 121°C por 15 minutos. Rango de pH: 7,4 ± 0,2. Ajustar de ser necesario con HCl 1N o NaOH 1N.

**2.7.4. Pruebas de control requeridas**

**2.7.4.1. Promoción de crecimiento**

Medios solidos no selectivos, Medios solidos selectivos. Dependiendo de la naturaleza del medio a utilizar se inocula una porción de inóculo de diferente naturaleza. <sup>(26)</sup>

Analizar cada partida de medio listo para usar y cada partida de medio preparado a partir de medio deshidratado o de los ingredientes indicados. <sup>(26)</sup>

“Inocular porciones / placas de Caldo Digerido de Caseína y soja y Agar Digerido de Caseína y Soja con un número pequeño (no más de 100 UFC) de los microorganismos indicados en tabla,

empleando una porción / placa individual de medio para cada uno ...” (26)

“Para medios sólidos, el crecimiento obtenido no debe diferir en un factor mayor de 2 a partir del valor calculado para un inóculo estandarizado. Para un inóculo recién preparado, se produce un crecimiento de microorganismos comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizado y aprobado previamente. Los medios líquidos son adecuados si se produce un crecimiento claramente visible de microorganismos...” (26)

## **2.8. Equipos y materiales de laboratorio**

### **2.8.1. Equipos de laboratorio**

#### **2.8.1.1. Cabina de seguridad biológica o de Bioseguridad**

Son equipos que proporcionan una barrera de contención para trabajar de forma segura con agentes infecciosos. Se les conoce igualmente bajo otras denominaciones tales como cabinas de bioseguridad, campanas microbiológicas o campanas de flujo laminar. Sin embargo, este último término podría llevar a un lector desprevenido a interpretaciones erróneas, por existir equipos aparentemente similares que han sido desarrollados para efectuar otro tipo de actividades, en las cuales se requiere de algunas condiciones de aislamiento que pueden no tener nada que ver con microorganismos. Entre esta última categoría estarían los denominados “Bancos de trabajo limpio” (horizontales o verticales) siendo sus principales usuarios las industrias electrónicas y farmacéuticas. Dependiendo de su diseño y clasificación, las

cabinas de seguridad biológica son adecuadas para proteger al: Trabajador, Medio ambiente y Producto. <sup>(27)</sup>

La protección se logra mediante la combinación de elementos electromecánicos/electrónicos (motor, ventilador, filtro, ductos, iluminación, etc.), y procesos físicos (flujo laminar, diferencias de presiones) que impulsan el aire a través de unos filtros especiales de gran superficie, estratégicamente situados, que tienen una eficiencia mínima de retención de partículas del 99,99%, cuando el tamaño de las mismas es en promedio de 0,3  $\mu\text{m}$  (micrómetros). Dichos filtros se conocen internacionalmente como filtros HEPA y resultan adecuados para retener los aerosoles que se generan cuando se realizan procedimientos experimentales con agentes biológicos como agitación, centrifugación o mezcla. <sup>(27)</sup>

#### **2.8.1.2. Balanza analítica**

Es un instrumento que sirve para medir la masa. Utilizada principalmente para medir pequeñas masas. Este tipo de balanza es uno de los instrumentos de medida más usados en laboratorio y de la cual dependen básicamente todos los resultados analíticos.

Las balanzas analíticas modernas, que pueden ofrecer valores de precisión de lectura de 0,1  $\mu\text{g}$  a 0,1 mg, están bastante desarrolladas de manera que no es necesaria la utilización de cuartos especiales para la medida del peso. Aun así, el simple empleo de circuitos electrónicos no elimina las interacciones del sistema con el ambiente. De estos, los efectos físicos son los más importantes porque no pueden ser suprimidos. <sup>(28)</sup>

### **2.8.1.3. Autoclave automática**

Dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura, evitando con las altas presiones que el agua llegue a ebullición a pesar de su alta temperatura. El fundamento del autoclave es que coagula las proteínas de los microorganismos debido a la presión y temperatura. Las autoclaves funcionan permitiendo la entrada o generación de vapor de agua pero restringiendo su salida, hasta obtener una presión interna de 103 kPa, lo cual provoca que el vapor alcance una temperatura de 121 grados centígrados. Un tiempo típico de esterilización a esta temperatura y presión es de 15-20 minutos. Las autoclaves más modernas permiten realizar procesos a mayores temperaturas y presiones, con ciclos estándares a 134 °C a 200 kPa durante 5 min para esterilizar material metálico; llegando incluso a realizar ciclos de vacío para acelerar el secado del material esterilizado. <sup>(29)</sup>

### **2.8.1.4. Incubadora**

Es un equipo diseñado para mantener una cámara a temperatura, atmósfera y humedad controladas, con el fin de conservar organismos vivos en un entorno que resulte adecuado para su crecimiento. Entre las aplicaciones más comunes, se citan las siguientes: incubación de cultivos bacteriológicos, virales, micológicos, celulares, determinación de la demanda biológica de oxígeno (DBO) y conservación de biológicos. Las incubadoras varían en complejidad y diseño. Algunas únicamente controlan la temperatura,

mientras que otras, además, controlan la composición atmosférica. <sup>(30)</sup>

#### **2.8.1.5. Micropipeta**

Es un instrumento de laboratorio empleado para succionar y transferir pequeños volúmenes de líquidos y permitir su manejo en las distintas técnicas analíticas. Los volúmenes captables por estos instrumentos varían según el modelo: los más habituales, denominados p20, p200 y p1000, admiten un máximo de 20; 200 y 1000 µl, respectivamente. Es de destacar que el uso de micropipetas permite emplear distintos líquidos sin tener que lavar el aparato: para ello, se emplean puntas desechables, de plástico, que habitualmente son estériles. Existen varios tipos de puntas: por ejemplo, las amarillas para pipetear volúmenes pequeños (por ejemplo, 10 µl), y las azules para pipetear volúmenes grandes (por ejemplo, 800 µl). <sup>(31)</sup>

### **2.8.2. Materiales de laboratorio**

#### **2.8.2.1. Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado y soluciones acompañantes <sup>\*(1)</sup>**

Composición del producto:

- 1 hisopo floqueado.
- 1 tubo de plástico con esponja impregnada con medio de transporte.
- Vial plástico con diluyente estéril.

#### **2.8.2.2. Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado**

El hisopo cuenta con una punta que está cubierta de fibras cortas de Nylon que se encuentran

dispuestas en forma perpendicular, lo que facilita el proceso de elución.

Su mango de plástico es flexible y delgado lo que facilita en gran medida la recolección de las muestras en áreas de difícil acceso. Además es el material más ergonómico pues no es rígido como el mango de plástico común, ni frío como el mango de aluminio.

Las fibras perpendiculares de nylon actúan como un cepillo suave y permiten una mejor recolección de las muestras celulares. La acción capilar que se lleva a cabo entre las hebras de fibra facilita la adsorción de la muestra líquida. <sup>(32)</sup>

#### **2.8.2.3. Hisopo Aplicador con punta de Algodón**

Cuerpo de madera con punta de algodón, no estéril. Dimensiones 150 mm (6").

**Envase:** Bolsa con 100 hisopos no estériles.

**Uso:** Es un instrumento utilizado para recoger muestras, para su posterior estudio, normalmente en medicina se usa para saber que gérmenes afecta a una infección, también se usa en cosméticos y en la limpieza de conductos auditivos. Tiene forma de bastoncillo acabado de una punta de algodón. <sup>(33)</sup>

## **2.9. Validación**

Establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. En la industria farmacéutica actualmente se encuentran métodos, normas y procedimientos obligatorios para la elaboración de sus productos. La FDA exige tener información documentada de cada uno de los métodos analíticos empleados.

Un método analítico debe validarse cuando se necesita verificar que sus parámetros de aptitud son adecuados para usar en problema analítico particular. Por ejemplo, cuando se desarrolla un método nuevo, cuando se revisa un método ya establecido para mejorar o extender a un nuevo problema, cuando el control de calidad indica que el método en uso está cambiando con el tiempo, cuando se usa un método ya establecido en un laboratorio diferente o con diferente analista o con diferente instrumental y para demostrar la equivalencia entre 2 métodos, por ejemplo, un método nuevo y una norma. <sup>(34; 35)</sup>

### 2.9.1. Tipos de validación

La validación de los métodos de control microbiológico persigue los mismos objetivos que la validación química y, en este sentido existe un paralelismo evidente. El trabajo en Microbiología, sin embargo, tiene unas peculiaridades que es necesario destacar. Los conceptos de organización y garantía de la calidad aplicable a un laboratorio microbiológico no difieren conceptualmente de los aplicables en otros laboratorios. Existen instrumentos y equipos característicos (autoclaves, incubadoras, equipos para identificación de microorganismos, cabinas de bioseguridad, etc.). Es necesario estandarizar cuidadosamente todos los factores que intervienen ya que al trabajar con microorganismos la variabilidad es mucho mayor. <sup>(35)</sup>

La farmacopea de los Estados Unidos (USP 40 NF 35) <1223> **Validación de Métodos microbiológicos alternativos**, <1225> **Validación de Procedimientos Farmacopeicos** indica las características analíticas típicas para la validación de un método. <sup>(34; 35)</sup>

## **2.9.2. Parámetros de validación**

### **2.9.2.1. Especificidad**

Se demuestra mediante la recuperación comparable del panel de microorganismos de desafío en los métodos farmacopeicos y alternativos. El desafío microbiano está por encima del límite de detección o de cuantificación pero a un nivel que provee una medición de la eficacia de los métodos. *Basado en crecimiento-Agregar* cantidades bajas (alrededor de 100 UFC) de cada microorganismo en el panel y llevar a cabo los métodos farmacopeico y alternativo para demostrar la recuperación del microorganismo. (34; 35)

### **2.9.2.2. Límite de detección**

Se define como el número más bajo de microorganismos en un volumen definido de muestra que puede ser detectado, aunque no necesariamente cuantificado, en las condiciones experimentales declaradas. (34; 35)

### **2.9.2.3. Robustez**

La capacidad del método para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del método, p.ej., volumen de reactivo, tiempo de incubación o temperatura ambiente, representa un indicador de su confiabilidad durante uso normal. La medición de la robustez no es una comparación entre el método farmacopeico y el alternativo, sino un componente necesario de la validación del método alternativo de manera que el usuario entienda los límites de los parámetros operativos del método. El usuario puede confiar en los datos provistos por el fabricante del método de prueba. (34; 35)

#### **2.9.2.4. Tolerancia**

El grado de precisión de los resultados de la prueba obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones normales de prueba, tales como el empleo de diferentes analistas (por ejemplo, tres), instrumentos y lotes de reactivos (el método para la demostración puede seguir las recomendaciones del proveedor de instrumentos o materiales, o podría basarse únicamente en datos provistos por el fabricante del método).<sup>(34; 35)</sup>

#### **2.9.2.5. Exactitud**

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero.<sup>(34; 35)</sup>

#### **2.9.2.6. Precisión**

Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad.<sup>(34; 35)</sup>

#### **2.9.2.7. Límite de cuantificación**

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente como concentración de analito (p.ej., porcentaje, partes por billón) en la muestra.<sup>(34; 35)</sup>

### 2.9.2.8. Linealidad

Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. (34; 35)

**Tabla N° 6: Parámetros de Validación por Tipo de Prueba Microbiológica.**

Parámetro de Validación	Pruebas Cualitativas	Pruebas Cuantitativas
Exactitud	No	Sí
Precisión	No	Sí
Especificidad	Sí	Sí
Límite de detección	Sí	Sí
Límite de cuantificación	No	Sí
Linealidad	No	Sí
Intervalo (dinámico) operativo	No	Sí
Robustez	Sí	Sí
Repetibilidad	Sí	Sí
Tolerancia	Sí	Sí
Equivalencia	Sí	Sí

**Fuente: USP 40 NF 35 Capítulo <1225> (35)**

### III. HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis general

¿Cuál es el método analítico de monitoreo de superficie por hisopado en la industria farmacéutica con mayor porcentaje (%) de recobro, tal que permita su posterior validación e implementación?

#### 3.2. Variables

##### 3.2.1. Variable independiente

- Métodos Analíticos para Monitoreo de Superficie por Hisopado.

##### 3.2.2. Variable dependiente

- Porcentaje (%) de recobro.

### IV. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

#### 4.1. Tipo de estudio

##### 4.1.1. Según estrategia aplicada

De Campo

##### 4.1.2. Según el nivel y alcance

Descriptiva-longitudinal

##### 4.1.3. Según tendencia o enfoque

Cualitativa

##### 4.1.4. Según el propósito u orientación

Aplicada

##### 4.1.5. Diseño de investigación

Observacional-longitudinal-prospectivo

#### 4.2. Población de estudio

La farmacopea de los Estados Unidos (USP 40 NF 35 <1223>

**Validación de métodos microbiológicos alternativos** indica; Se puede usar cualquier tamaño de muestra y número de pruebas que sea suficiente para producir una decisión equivalente.

Cualquier método de prueba microbiológico alternativo (dentro de su propósito previsto) puede usar cualquier tamaño de muestra y número de pruebas que sea suficiente para producir una decisión

equivalente (o mejor) con respecto a la calidad microbiológica en comparación con el método de referencia. Puede ser más simple para muchos, si no es para la mayoría de los métodos alternativos, cumplir con las instrucciones de muestreo que se proveen en el método farmacopeico oficial. Para los casos en que se utiliza el enfoque de muestreo definido en el método farmacopeico oficial, no se requiere justificación del tamaño de la muestra. <sup>(34)</sup>

#### **4.3. Criterios de selección**

Las zonas para evaluar (áreas limpias), serán simuladas en una placa Petri estéril donde se inocula el microorganismo y se procederá hacer el monitoreo analítico de superficie por hisopado con los métodos a ser evaluados.

#### **4.4. Métodos de análisis de datos**

- Por porcentaje, con referencia al estándar Biológico. (% Recobro)

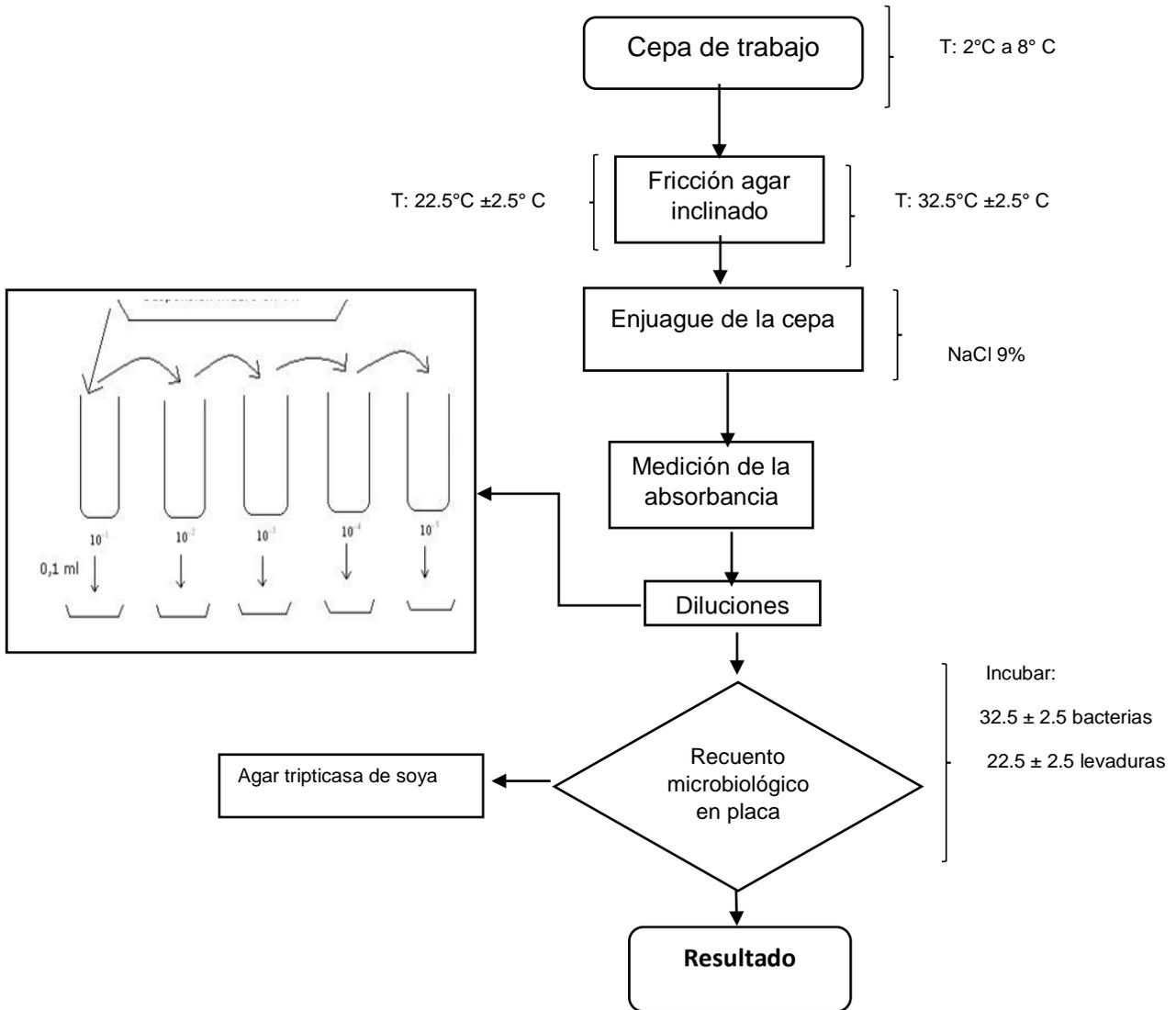
## V. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA

### 5.1. Estandarización de Inóculo

La operación nos permitirá tener un referente o estándar de trabajo, con el cual podremos comparar la recuperación de la carga microbiana teniendo como concentración inicial no más de 100 Unidades formadoras de colonia ( $\leq 100$  UFC), trabajar con tres cepas de referencia: *Staphylococcus aureus* (**ATTC 6538**); *Escherichia coli* (**ATCC 8739**) y *Pseudomona Aeruginosa* (**ATCC 9027**).

- Activar la cepa (hisopo) en un agar nutritivo inclinado por medio de la fricción según la naturaleza de esta: bacteria incubaremos por 24 horas.
- Enjuagar el crecimiento presente en el agar nutritivo, con cloruro de sodio al 9%.
- Llevar el enjuague al espectrofotómetro, a una absorbancia de 580 nm.
- Con la cepa pura, procederemos a las diluciones.
- Recuento microbiológico en placa
- Llevar a incubar a temperatura:  $32.5 \pm 2.5$  por 24 horas: Bacterias.
- Determinar en qué concentración se halla no más de 100 Unidades formadoras de colonia ( $\leq 100$  Ufc).
- Reportar.

# Flujograma N°1: Estandarización de Inóculo.



## 5.2. Promoción de crecimiento e inhibitorio de los medios

Los medios usados en este procedimiento deben ser capaces de permitir el crecimiento microbiano. Analizar cada partida de medio listo para usar y cada partida de medio preparado a partir de medio deshidratado o de los ingredientes descritos. Para medios sólidos, los recuentos obtenidos deben ser al menos 50% del valor calculado para un inóculo estandarizado. Para un inóculo recientemente preparado, se produce un crecimiento de microorganismos comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente. <sup>(20)</sup>

- Mediante recuento microbiológico en placa.
- Llevar a incubar a temperatura:  $32.5 \pm 2.5$  por 24 horas: Bacterias.
- Reportar.

**Tabla N° 7: Promoción del crecimiento medios no selectivos.**

ORGANISMO	MEDIO APROPIADO	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN DEL INÓCULO	TIEMPO DE INCUBACIÓN DE RECUPERACIÓN MICROBIANA
<i>Escherichia coli</i> (ATCC N° 8739)	Caldo Digerido de Caseína y Soja; Agar Digerido de Caseína y Soja	$32,5 \pm 2,5^{\circ}$	18-24 horas	3-5 días
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC N° 9027)	Caldo Digerido de Caseína y Soja; Agar Digerido de Caseína y Soja	$32,5 \pm 2,5^{\circ}$	18-24 horas	3-5 días
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC N° 6538)	Caldo Digerido de Caseína y Soja; Agar Digerido de Caseína y Soja	$32,5 \pm 2,5^{\circ}$	18-24 horas	3-5 días

**Fuente:** USP 40 NF 35 Capitulo<61> <sup>(26)</sup>

**Tabla N° 8: Promoción del crecimiento medios selectivos.**

PRUEBA/MEDIO	PROPIEDAD	CEPAS DE PRUEBA
<b><u>Prueba de Escherichia coli</u></b> Caldo MacConkey	Promoción del crecimiento Inhibitoria	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
Agar MacConkey	Promoción del crecimiento + Indicadora	<i>E. coli</i>
<b><u>Prueba de Pseudomonas aeruginosa</u></b> Agar Cetrimida	Promoción del crecimiento Inhibitoria	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
<b><u>Prueba de Staphylococcus aureus</u></b> Agar Manito! Salado	Promoción del crecimiento + Indicadora Inhibitoria	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>

Fuente: USP 40 NF 35 Capitulo<61> (26)

### 5.3. Preparación de medios de cultivo

#### 5.3.1. Preparación de Medios Líquidos

- Aplica para la preparación de los siguientes medios: Solución Amortiguadora de Caldo Cloruro de Sodio Peptona de pH 7,0 (AP), Caldo Peptona Caseína Polisorbato (CPLP).
- De acuerdo al volumen requerido del medio, calcular la cantidad necesaria a pesar según lo declarado por el fabricante en la etiqueta del frasco.
- Obtenida la cantidad necesaria, proceder a pesar en la balanza calibrada sobre un papel glasine.
- Verter la cantidad pesada en el balón de vidrio y agregar gradualmente la cantidad de agua requerida, agitando continuamente el balón para lograr la completa solubilidad del medio.
- Ajustar el pH de ser necesario con: solución de hidróxido de sodio 1N ó solución de ácido Clorhídrico 1N, de acuerdo al pH especificado para cada medio de cultivo.
- Distribuir el medio preparado en frascos de vidrio o tubos.

- Proceder a cerrar los frascos ó tubos, colocando la tapa rosca.
- Identificar cada uno de los envases con el Lote asignado para cada medio de cultivo preparado, indicando: el volumen preparado, la fecha de preparación y la fecha de vigencia.
- Adherir la cinta indicadora de esterilización para calor húmedo, al frasco ó balón.
- Proceder a medir el pH, después del control de esterilidad del medio de cultivo.
- Almacenar los envases conteniendo los medios de cultivo a temperatura ambiente hasta su uso.

### **5.3.2. Preparación de Medios de Cultivo - Sólidos**

- Aplica para los medios de cultivo: Agar Trypticase Soya Agar (TSA), Agar Mac Conkey (MC), Agar Cetrimide (CET), Agar Manitol Salado (MAN), Agar Plate Count (PCA).
- Verificar que el lote del medio de cultivo solido a usar se encuentre vigente.
- De acuerdo al volumen requerido del medio, calcular la cantidad necesaria a pesar del medio según lo declarado por el fabricante en la etiqueta del frasco.
- Verter la cantidad pesada en el frasco de vidrio ó en los balones, agregar gradualmente la cantidad de agua requerida agitando continuamente el frasco ó balón hasta su disolución total, no debe visualizarse sedimento en la base.
- Enfriar el medio a temperatura ambiente.
- Proceder a medir el pH y ajustar de ser necesario con solución de hidróxido de sodio 1N ó solución de ácido clorhídrico 1N al pH especificado para cada medio de cultivo.

- Colocar la tapa rosca ó cubrir la boca del balón con doble papel Platina, papel glasine y Papel Kraff, sujetar con ligas.
- Identificar cada uno de los envases con el Lote asignado para cada medio de cultivo preparado, indicando: el volumen preparado, la fecha de preparación y la fecha de vigencia.
- Adherir la cinta indicadora de esterilización para calor húmedo, a cada envase.
- Esterilización en autoclave.
- Almacenar los envases conteniendo los medios de cultivo.

#### **5.4. Esterilización**

- Colocar los medios preparados en la canastilla de la autoclave Laboklav.
- Proceder a esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Concluido el proceso de esterilización, retirar los medios preparados enfriar hasta temperatura ambiente.
- Verificar que las cintas indicadoras de esterilización por vapor han virado a un color negro (indicador de esterilidad).
- Colocar todos los frascos de cada lote de medio de cultivo preparado é incubar de 30 a 35°C mínimo 24 horas antes de su uso, para la verificación de la esterilidad de los medios.
- Los medios de cultivo para plaqueo se mantiene a baño maría a una temperatura de 45°C antes de proceder a su distribución en las placas.
- Distribuir en placas estériles volúmenes de 15 a 20 mL por placa.
- Dejar solidificar e identificar con el lote de medio preparado en la base de la placa.
- Llevar a control por incubación a temperatura de 30 a 35 °C mínimo 24 antes de su uso.
- Proceder a medir el pH, de los medios de cultivo preparados, después de su control de esterilidad.

## **5.5. Métodos de monitoreo de superficie por hisopado**

### **5.5.1. Método Hisopo Aplicador con punta de Algodón + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato**

- El personal calificado ingreso con indumentaria adecuada (gorra, mascarilla, gafas, mandilón) al área donde se encuentra la cabina de seguridad biológica o de Bioseguridad.
- Aquí ya se encontraba las Superficies de contacto simuladas (placas petris), el material para inocular.
- Tomar la superficies de contacto simuladas(placa Petri) y con ayuda de una plantilla delimitaremos la zona de 5 x 5 cm<sup>2</sup>. inocularemos la cepa estandarizada que contiene no más de 100 unidades formadoras de colonia.(≤100 UFC)
- Sumergir el Hisopo Aplicador con punta de Algodón en el tubo conteniendo el caldo peptona lecitina polisorbato y realizar una fricción sobre la superficie inoculada(placa Petri) a muestrear 25 cm<sup>2</sup> (5x5 cm)
- Inmediatamente hacer movimientos rotatorios sobre la placa Petri que contiene Agar Tripticasa de Soya (TSA), hasta agotamiento.
- Colocar el hisopo en el tubo de caldo peptona lecitina polisorbato 10 ml (CPLP).
- Se incubo los tubos y las placas a una temperatura de 30 a 35 °C por 48 horas para bacterias, cumplido el tiempo de incubación anterior, pasar las placas a temperatura de 20 a 25 °C por 3 días más, para recuento de hongos y levaduras.
- De presentar turbidez, estriar a los medios diferenciales para descartar patógenos: Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus.

### **5.5.2. Método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon Estéril Floqueado y soluciones acompañantes.**

- El personal calificado ingreso con indumentaria adecuada (gorra, mascarilla, gafas, mandilón) al área donde se encuentra la Cabina de seguridad biológica o de Bioseguridad.
- Aquí ya se encontraba las Superficies de contacto simuladas (placas petris), el material para inocular.
- Tomar la superficies de contacto simuladas (placa Petri) y con ayuda de una plantilla delimitaremos la zona de 5 x 5 cm<sup>2</sup>, inocularémos la cepa estandarizada que contiene no más de 100 unidades formadoras de colonia. ( $\leq 100$  UFC).
- Sumergir el Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado en el vial conteniendo solución estéril, retirar el excedente en las paredes del tubo y realizar una fricción sobre la superficie inoculada(placa Petri) a muestrear 25 cm<sup>2</sup> (5x5 cm)
- Inmediatamente hacer movimientos rotatorios sobre la placa Petri que contiene Agar Tripticosa de Soya (TSA), hasta agotamiento.
- Colocar el hisopo en el tubo de transporte y dejar reposar por 20 minutos.
- Se incubo los tubos y las placas a una temperatura de 30 a 35 °C por 48 horas para bacterias, cumplido el tiempo de incubación anterior, pasar las placas a temperatura de 20 a 25 °C por 3 días más, para recuento de hongos y levaduras.
- De presentar turbidez, estriar a los medios diferenciales para descartar de patógenos: Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus.

### **5.5.3. Método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona.**

- El personal calificado ingreso con indumentaria adecuada (gorra, mascarilla, gafas, mandilón) al área donde se encuentra la Cabina de seguridad biológica o de Bioseguridad.
- Aquí ya se encontraba las superficies de contacto simuladas (placas petris), el material para inocular.
- Tomar la superficies de contacto simuladas (placa Petri) y con ayuda de una plantilla delimitaremos la zona de 5 x 5 cm<sup>2</sup>, inocularémos la cepa estandarizada que contiene no más de 100 unidades formadoras de colonia. ( $\leq 100$  UFC).
- Sumergir el Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado en el tubo conteniendo Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona 10 ml (AP) , retirar el excedente en las paredes del tubo y realizar una fricción sobre la superficie inoculada(placa Petri) a muestrear 25 cm<sup>2</sup> (5x5 cm)
- Inmediatamente hacer movimientos rotatorios sobre la placa Petri que contiene Agar Tripticasa de Soya (TSA), hasta agotamiento.
- Colocar el hisopo Estéril en un tubo conteniendo Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona 10 ml (AP).
- Se incubo los tubos y las placas a una temperatura de 30 a 35 °C por 48 horas para bacterias, cumplido el tiempo de incubación anterior, pasar las placas a temperatura de 20 a 25 °C por 3 días más, para recuento de hongos y levaduras.
- De presentar turbidez, estriar a los medios diferenciales para descarte de patógenos: Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus.

#### **5.5.4. Método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato**

- El personal calificado ingreso con indumentaria adecuada (gorra, mascarilla, gafas, mandilón) al área donde se encuentra la Cabina de seguridad biológica o de Bioseguridad.
- Aquí ya se encontraba las superficies de contacto simuladas (placas petris), el material para inocular.
- Tomar la superficies de contacto simuladas (placa Petri) y con ayuda de una plantilla delimitaremos la zona de 5 x 5 cm<sup>2</sup> inocularemos la cepa estandarizada que contiene no más de 100 unidades formadoras de colonia. ( $\leq 100$  UFC).
- Sumergir el Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado en el tubo conteniendo Caldo Peptona Lecitina Polisorbato 10 ml (CPLP), retirar el excedente en las paredes del tubo y realizar una fricción sobre la superficie inoculada(placa Petri) a muestrear 25 cm<sup>2</sup> (5x5 cm)
- Inmediatamente hacer movimientos rotatorios sobre la placa Petri que contiene Agar Tripticasa de Soya(TSA), hasta agotamiento.
- Colocar el hisopo Estéril en un tubo conteniendo Caldo Peptona Lecitina Polisorbato 10 ml(CPLP)
- Se incubo los tubos y las placas a una temperatura de 30 a 35 °C por 48 horas para bacterias, cumplido el tiempo de incubación anterior, pasar las placas a temperatura de 20 a 25 °C por 3 días más, para recuento de hongos y levaduras.
- De presentar turbidez, estriar a los medios diferenciales para descarte de patógenos: Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus.

## VI. RESULTADOS

Tabla N° 9							
Porcentaje (%) recobro - Hisopo Aplicador con punta de Algodón Estéril Caldo Peptona Lecitina Polisorbato							
Fecha	Microorganismo	ATCC	INÓCULO	Inóculo Inicial ( Concentración / UFC)	Promedio UFC / Placa	Porcentaje Recobro	Promedio Porcentaje Recobro (%)
04/07/2016	S. aureus	6538	≤ 50 UFC	37	5	14	15
					6	16	
			≤ 100 UFC	72	10	14	17
					15	21	
	≤ 200 UFC	130	16	12	13		
			18	14			
	E. coli	8739	≤ 50 UFC	44	11	25	25
					11	25	
≤ 100 UFC			80	12	15	19	
				18	23		
≤ 200 UFC	165	29	18	19			
		33	20				
05/12/2016	P. aeruginosa	9027	≤ 100 UFC	21	3	14	14
					3	14	
					3	14	
					3	14	

**Tabla N° 9:** Los resultados obtenidos según método, tipo de ATCC y concentración.  
 ATCC 6538 (S.aureus) ; Concentraciones 37 UFC (15%); 72 UFC (17%);130 (13%).  
 ATCC 8739 (E. coli) ; Concentraciones 44 UFC (25%); 80 UFC (19%);165 (19%).  
 ATCC 9027 (P.aeruginosa); Concentración 21 UFC (14%).

Tabla N° 10							
Porcentaje (%) recobro - Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Soluciones acompañantes.							
Fecha	Microorganismo	ATCC	INÓCULO	Inóculo Inicial ( Concentración / UFC)	Promedio UFC / Placa	Porcentaje Recobro	Promedio Porcentaje Recobro (%)
04/07/2016	S. aureus	6538	≤ 50 UFC	37	1	3	3
					1	3	
			≤ 100 UFC	72	2	3	3
					2	3	
			≤ 200 UFC	130	6	5	5
					8	6	
	E. coli	8739	≤ 50 UFC	44	2	5	5
					2	5	
			≤ 100 UFC	80	4	5	5
					4	5	
≤ 200 UFC	165	7	4	5			
		8	5				
06/12/2016	P. aeruginosa	9027	≤ 100 UFC	46	6	13	13
					6	13	
					6	13	
					5	11	

**Tabla N° 10:** Los resultados obtenidos según método, tipo de ATCC y concentración.

ATCC 6538 (S.aureus) ; Concentraciones 37 UFC (3%); 72 UFC(3%);130 (5%).

ATCC 8739 (E. coli); Concentraciones 44 UFC (5%); 80 UFC(5%);165 (5%).

ATCC 9027 (P.aeruginosa); Concentración 46 UFC(13%).

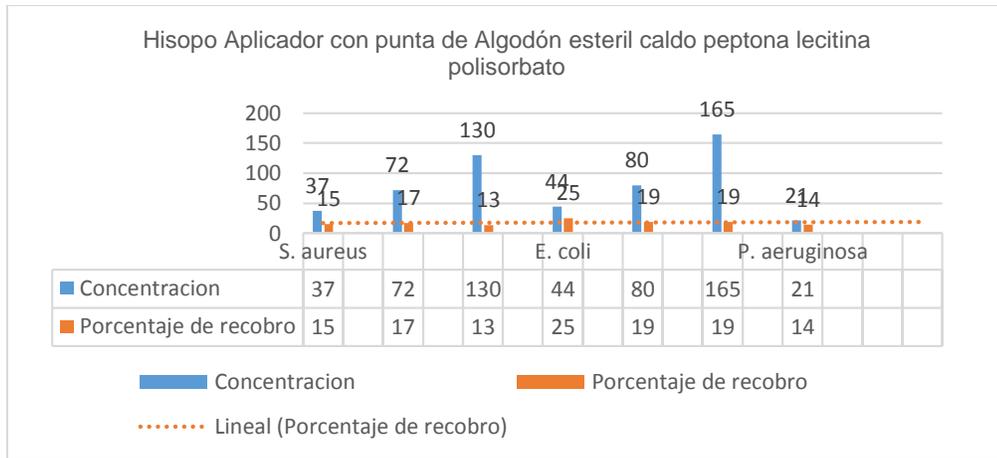
Tabla N° 11							
Porcentaje (%) recobro - Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona							
Fecha	Microorganismo	ATCC	INÓCULO	Inóculo Inicial (Concentración / UFC)	Promedio UFC / Placa	Porcentaje Recobro	Promedio Porcentaje Recobro (%)
27/11/2017	P. aeruginosa	9027	≤ 100 UFC	36	6	5.5	15.3
					6		
					5		
					5		
	S. aureus	6538			17	14.8	41.0
					13		
					16		
					13		
	E.coli	8739			6	6.3	17.4
					5		
					7		
					7		

**Tabla N° 11:** Los resultados obtenidos según método y tipo de ATCC. Concentración. 36 UFC ; 9027(P.aeruginosa)(15.3%);ATCC6538(S.aureus)(41.0%);ATCC 8739 (E. coli)(17.4%).

Tabla N° 12							
Porcentaje (%) recobro - Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado +Caldo Peptona Lecitina Polisorbato							
Fecha	Microorganismo	ATCC	INÓCULO	Inóculo Inicial (Concentración / UFC)	Promedio UFC / Placa	Porcentaje Recobro	Promedio Porcentaje Recobro (%)
27/11/2017	P. aeruginosa	9027	≤ 100 UFC	36	2	2.0	5.6
					2		
					4		
					<1		
	S. aureus	6538			6	3.8	10.4
					2		
					4		
					3		
	E.coli	8739			6	3.8	10.4
					3		
					3		
					3		
					<1		

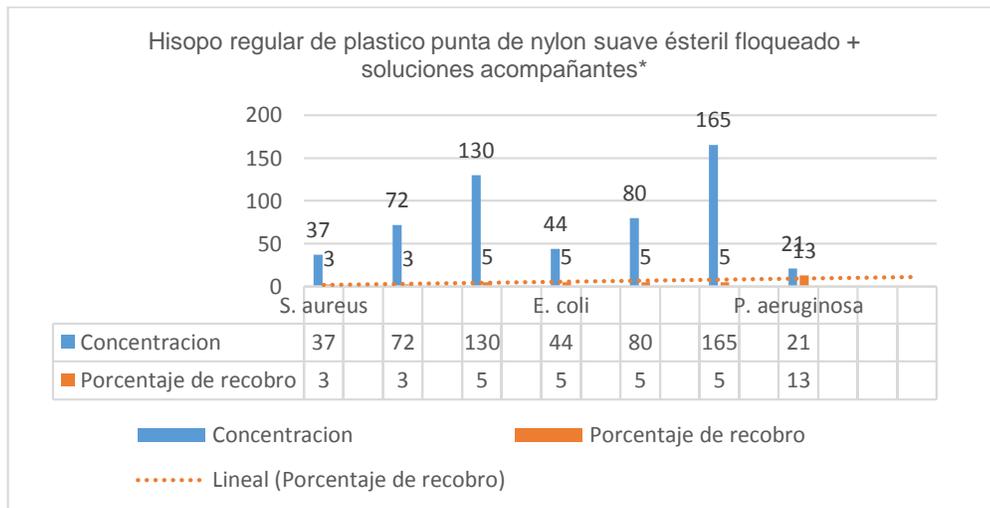
**Tabla N° 12:** Los resultados obtenidos según método y tipo de ATCC. Concentración 36 UFC; 9027(P.aeruginosa)(5.6%); ATCC6538(S.aureus)(10.4%); ATCC 8739 (E. coli)(10.4%).

**Gráfico N° 1: Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Aplicador con punta de Algodón Estéril Caldo Peptona Lecitina Polisorbato**



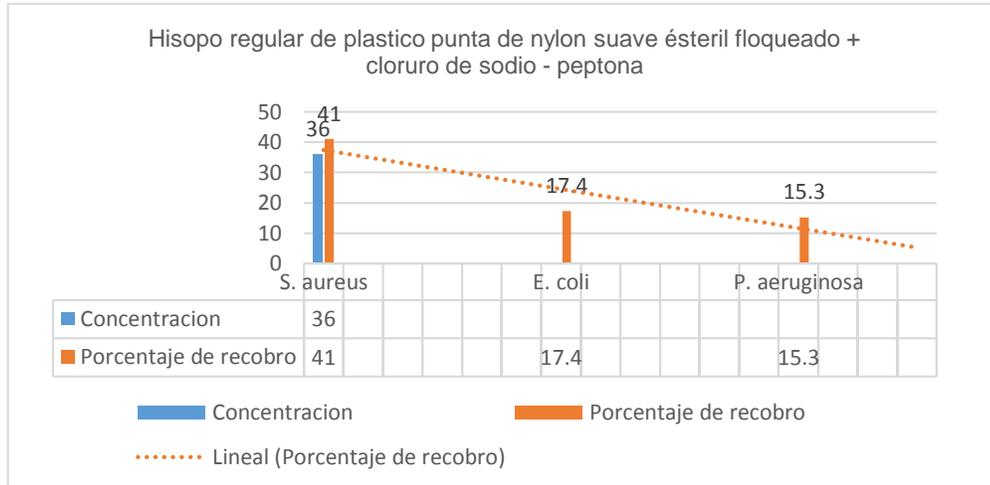
**Gráfico N° 1:** Resultados obtenidos con mayor porcentaje (%) de recobro, independientemente del tipo de ATCC y concentración. .ATCC 6538 (*S.aureus*):17%; ATCC 8739 (*E. coli*):25%;ATCC 9027 (*P.aeruginosa*):14%.

**Gráfico N° 2: Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Soluciones acompañantes.**



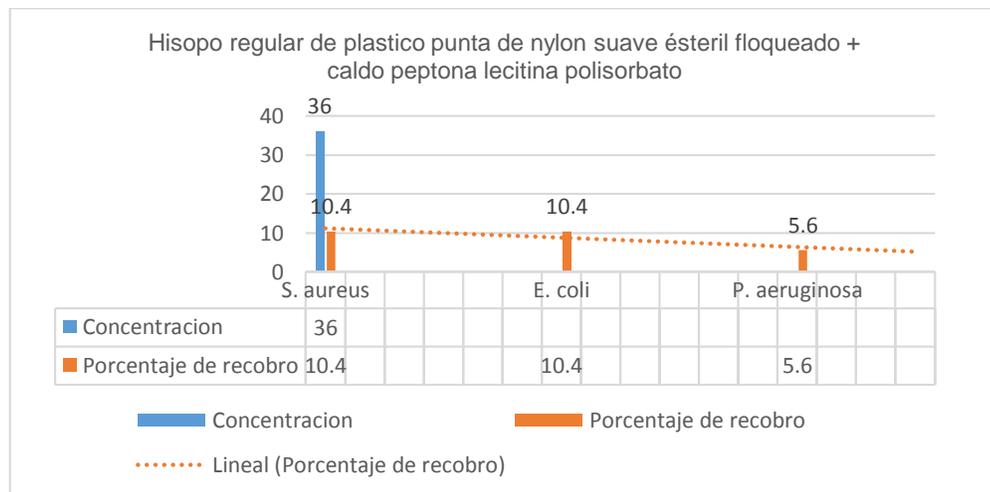
**Gráfico N° 2:** Resultados obtenidos con mayor porcentaje (%) de recobro, independientemente del tipo de ATCC y concentración. ATCC 6538 (*S. aureus*):5%; ATCC 8739 (*E. coli*):5%. ATCC 9027 (*P.aeruginosa*):13%.

**Gráfico N° 3: Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona**



**Gráfico N° 3:** Resultados obtenidos con mayor porcentaje (%) de recobro, independientemente del tipo de ATCC 9027(*P. aeruginosa*):15.3%; ATCC6538(*S.aureus*):41.0%;ATCC 8739 (*E. coli*):17.4%.

**Gráfico N° 4: Resultados por porcentaje de recobro – Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado +Caldo Peptona Lecitina Polisorbato**



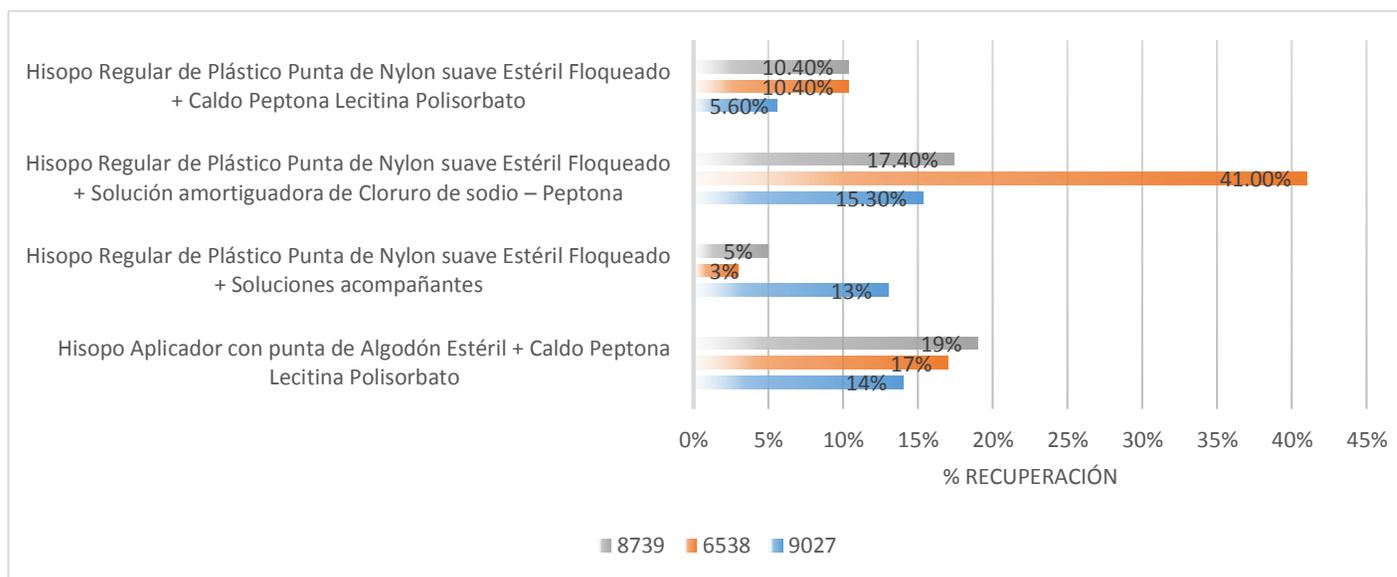
**Gráfico N° 4:** Resultados obtenidos con mayor porcentaje (%) de recobro, independientemente del tipo de ATCC.9027(*P.aeruginosa*):5.6%;ATCC6538(*S.aureus*):10.4%;ATCC 8739 (*E. coli*):10.4%.

**Tabla N° 13: Resultados por porcentaje de recobro – métodos analíticos de monitoreo de superficie.**

<b>MÉTODO</b>	<b>9027</b>	<b>6538</b>	<b>8739</b>
Hisopo Aplicador con punta de Algodón Estéril + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato	14%	17%	19%
Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Soluciones acompañantes	13%	3%	5%
Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona	<b>15.30%</b>	<b>41.00%</b>	<b>17.40%</b>
Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato	5.60%	10.40%	<b>10.40%</b>

**Tabla N° 13:** Resultados comparativos por porcentaje de recobro y tipo de ATCC; que permite determinar el método con mejor respuesta para su validación.

**Gráfico N° 5: Resultados por porcentaje de recobro – métodos analíticos de monitoreo de superficie.**



**Gráfico N° 1:** Se observa que si bien los métodos no presentan resultados homogéneos; Se considera el método que presenta mayor porcentaje (%) de recobro, en más de una ATCC. Es el método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona. ATCC 9027(15.30%); ATCC 6538 (41%) y ATCC 8739(17.4%)

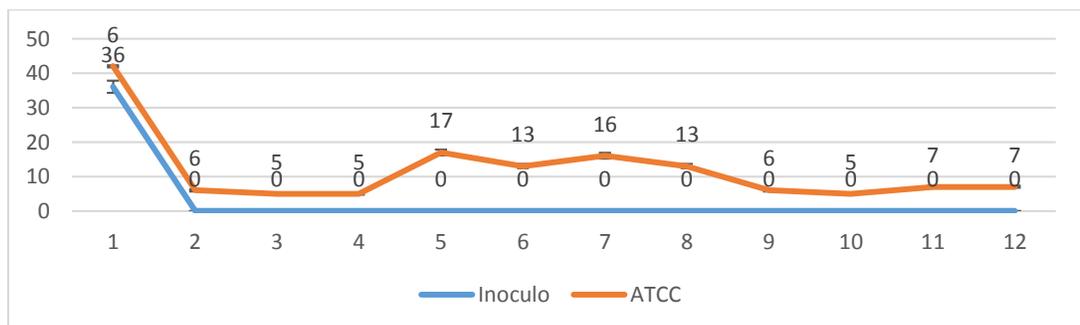
**Tabla N° 14: Parámetros de validación – método analítico con mayor porcentaje (%) recobro.**

PARÁMETROS	HISOPO REGULAR DE PLÁSTICO PUNTA DE NYLON SUAVE ESTÉRIL FLOQUEADO + SOLUCION AMORTIGUADORA DE CLORURO DE SODIO – PEPTONA
Exactitud	Cumple
Precisión	
Selectividad	
Límite de detección	
Límite de cuantificación	
Linealidad	
Robustez	Cumple
Repetibilidad**	Confidencial
Tolerancia**	Confidencial
<b>** Confidencial (Laboratorio Farmacéutico)</b>	

**6.1. Parámetros evaluados en la validación del Método Analítico de Monitoreo de superficies por hisopado en la Industria Farmacéutica:**

**6.1.1. Exactitud**

**Gráfico N° 6: Resultado de exactitud**



**Gráfico N° 2:** Los resultados obtenidos entre muestras analizadas por el método analítico de superficie; presentan proximidad, pero presentan una recuperación mínima frente al verdadero valor.

### 6.1.2. Precisión

Muestra trabajada por duplicado, la cual no debe exceder RSD (Desviación Estándar Relativa) es de 35%, mayor a esto se cuestionaría la prueba.

**Tabla N° 15: Resultados de precisión**

Muestras Nivel (%)	Ensayo	Cantidad Añadida (UFC)	ATCC	Cantidad Hallada (UFC)	(%) Recuperación (Rc)	Recuperación Media (%)	Promedio por Concentraciones (%)	RSD (%)			
100%	M1	36.000	9027	6	16.7	16.7	15.3	10.4973			
				6	16.7						
	M2			5	13.9	13.9					
				5	13.9						
	M1		6538	17	47.2	41.7	41.0	13.9766			
				13	36.1						
				M2	16	44.4			40.3		
	13				36.1						
	M1			8739	6	16.7			15.3	17.4	15.3188
					5	13.9					
			M2		7	19.4	19.4				
	7				19.4						

### 6.1.3. Selectividad

Cada microorganismo es trabajado con su respectivo medio de cultivo específico, el cual permite el desarrollo de sus características morfológicas; Según corresponda.

### 6.1.4. Robustez

Los microorganismos, medios y caldos de cultivo recibieron controles según lo establecidos en la farmacopea y durante el proceso que garanticen los resultados tales como pH, Temperatura, humedad, tiempos de incubación, etc.

### 6.1.5. Linealidad

Ver Exactitud

**6.1.6. Límite de detección**

Se trabaja con concentración inicial menor a la requerida por la norma oficial;  $\leq 50$  UFC.

**6.1.7. Límite de cuantificación**

Se trabaja con concentraciones que permitan confirmar el porcentaje de recobro; sobre pasa los límites permitidos según lo requerido por la norma oficial  $\leq 50$ ,  $\leq 100$  y  $\leq 200$  UFC.

## VII. DISCUSIÓN

Con el presente estudio se validó e implementara el método analítico del monitoreo de superficie por hisopado en la industria farmacéutica.

Se realizó el método del Hisopo Aplicador con punta de Algodón Estéril + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato dando como resultado según tipo de ATCC y concentración ATCC 6538 (*S.aureus*); Concentraciones 37 UFC (15%); 72 UFC (17%); 130 (13%).ATCC 8739 (*E. coli*); Concentraciones 44 UFC (25%); 80 UFC (19%); 165 (19%).ATCC 9027 (*P.aeruginosa*); Concentración 21 UFC (14%), lo cual comparado con otro estudio según C. Gutierrez Arcila validación del proceso de limpieza y sanitización de un área de envase de producción de vacunas biológicas donde se utilizó el método placas de contacto Petri film e hisopos quick swap, arrojando un resultado dentro de la especificación en sus diversos monitoreos microbiológicos lo que confirman la importancia de un método para el logro de un proceso estandarizado y bajo control en lo cual destacamos los parámetros de una validación tanto en las diferentes áreas y equipos.

En lo referente a otro tipo de método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Soluciones acompañantes dando como resultado según tipo de ATCC y concentración ATCC 6538 (*S.aureus*); Concentraciones 37 UFC (3%); 72 UFC(3%); 130 (5%).ATCC 8739 (*E. coli*); Concentraciones 44 UFC (5%); 80 UFC(5%); 165 (5%).ATCC 9027 (*P.aeruginosa*); Concentración 46 UFC(13%), lo cual comparado con otro estudio según E. García Montoya; Pérez Lozano validación de los procesos de limpieza en la industria farmacéutica, mediante la aplicación del análisis de riesgo, seguridad, toxicología y UPLC, en lo cual mediante el análisis de trazas por el método de cromatografía líquida de alta eficacia, concluye con resultados dentro de la especificación para cada parámetro evaluado en el proceso de validación. Ambos estudios destacan los parámetros de una validación en las diferentes áreas y equipos con el fin de controlar las diversas contaminaciones presentes en los procesos de manufactura.

En lo referente a otro tipo de método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato dando como resultado según tipo de ATCC y concentración 36 UFC; 9027(*P.aeruginosa*) (5.6%); ATCC6538(*S.aureus*) (10.4%); ATCC 8739 (*E. coli*) (10.4%) donde buscamos identificar a través de resultados la validación de método con mayor porcentaje (%) de recobro comparado con H. Enrique Medina Reyna en su estudio de validación de un sistema de tratamiento de agua grado inyectable donde evalúa todos los sistemas y parámetros que aplica al agua grado inyectable.(pH, conductividad, metales pesados y recuento microbiano) por un tiempo determinado y mediante resultados estadísticos resuelve la conformidad del proceso en conjunto para la elaboración de sus productos inyectables. Ambos métodos buscan controlar las diversas contaminaciones presentes en los procesos de manufactura.

En lo referente a la evaluación de todos los métodos utilizados en la industria farmacéutica, que utilizan diferentes estrategias, todos buscan los cuidados respectivos en la fabricación del producto farmacéutico y evitar posibles contaminaciones cruzadas (API o excipiente), por microorganismos u otros. Comparado según lo reportado por Dirección General Medicamentos, Insumos y Drogas (Perú) reporta no conformidades procedentes de análisis de control de calidad de muestras pesquisadas a empresas farmacéuticas.

En lo referente a la evaluación de todos los métodos utilizados que si bien los no presentan resultados homogéneos; Se considera el método que presenta mayor porcentaje (%) de recobro, en más de una ATCC. Es el método Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución amortiguadora de cloruro de sodio – Peptona. ATCC 9027(15.30%); ATCC 6538 (41%) y ATCC 8739(17.4%), comparado según Delgado Escamilla; L.Perez A. Arias J. determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos esteriles a base de antibioticos B- lactamicos donde evalúa los sistemas de apoyo por método microbiológicos: sedimentación, hisopado y contacto de placas. Arrojando un resultado conforme a las

especificaciones de área y sistemas de apoyo. Determinando ambos estudios los límites de confianza y aceptación mediante resultados obtenidos en un tiempo determinado.

## VIII. CONCLUSIONES

Los procesos de validación son etapas importantes y necesarias que deben cumplirse para garantizar la confiabilidad de un método, equipo, o proceso. Al realizar la validación lo que interesa es poner en evidencia que un método, equipo o proceso funcionan de acuerdo a lo esperado.

- El porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Aplicador con punta de Algodón + Caldo Peptona Lecitina Polisorbato, evaluados por recuento microbiológico ( recuento en placa) fueron de acuerdo al tipo de ATCC y concentración los siguientes: ATCC 6538 (*S.aureus*) ; Concentraciones 37 UFC (15%); 72 UFC (17%);130 (13%).ATCC 8739 (*E. coli*) ; Concentraciones 44 UFC (25%); 80 UFC (19%);165 (19%).ATCC 9027 (*P.aeruginosa*); Concentración 21 UFC (14%). Lo cual este método nos permitió la evaluación de dos parámetros relacionados a la validación. (Limite de Detección y Limite de Cuantificación) obteniendo resultados similares en diferentes concentraciones. Teniendo en cuenta que el hisopo utilizado en este tipo de método no es el adecuado por características en el uso y forma.
- El porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Soluciones acompañantes, evaluados por recuento microbiológico ( recuento en placa) fueron de acuerdo al tipo de ATCC y concentración los siguientes: ATCC 6538 (*S.aureus*) ; Concentraciones 37 UFC (3%); 72 UFC(3%);130 (5%).ATCC 8739 (*E. coli*); Concentraciones 44 UFC (5%); 80 UFC(5%);165 (5%).ATCC 9027 (*P.aeruginosa*); Concentración 46 UFC(13%). Lo cual este método nos permitió la evaluación y funcionalidad de un nuevo kit utilizado en el laboratorio farmacéutico donde se realizo dicho estudio.

- El porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona evaluados por recuento microbiológico ( recuento en placa) fueron de acuerdo al tipo de ATCC y concentración los siguientes: 36 UFC ; 9027(P.aeruginosa)(15.3%);ATCC6538(S.aureus)(41.0%);ATCC 8739 (E. coli)(17.4%).Lo cual nos permitió identificar que este es el método analítico con mayor porcentaje (%) de recobro y que cumple con los criterios de aceptación según la obra oficial vigente (Farmacopea- Estados Unidos USP 40 NF 35).
- El porcentaje (%) de recobro del método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado +Caldo Peptona Lecitina Polisorbato evaluados por recuento microbiológico (recuento en placa) fueron de acuerdo al tipo de ATCC y concentración los siguientes: 36 UFC;9027(P. aeruginosa) (5.6%); ATCC 6538(S. aureus) (10.4%); ATCC 8739 (E. coli) (10.4%). Este método fue comparado con el método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Aplicador con punta de Algodón Estéril Caldo Peptona Lecitina Polisorbato; lo cual nos permitió determinar características en el uso y forma del hisopo.
- Los parámetros de validación del método analítico con mayor porcentaje (%) de recobro son: Especificidad, límite de detección , robustez , exactitud , precisión , límite de cuantificación , linealidad con lo cual garantizamos que el método analítico de monitoreo de superficie por Hisopo Regular de Plástico Punta de Nylon suave Estéril Floqueado + Solución Amortiguadora de Cloruro de sodio – Peptona, es el más adecuado y así garantiza que los productos farmacéuticos sean de alta calidad sin perjudicar la salud del paciente.

## **IX. RECOMENDACIONES**

1. El profesional responsable del departamento de control de calidad – Microbiología debe evaluar los posibles cambios que se puedan realizar en cuanto a métodos analíticos.
2. Realizar pruebas previas a los métodos nuevos y comparar el porcentaje de recuperación frente al método utilizado.
3. Conocer los distintos caldos nutritivos y soluciones de transporte reemplazables en el método de muestreo de superficies,
4. El profesional químico farmacéutico debe estandarizar las concentraciones a ser recuperadas del estándar biológico.
5. Realizar monitoreos de superficie utilizando hisopos similares a los de la prueba realizada.
6. Implementar tabla estadística de incidencias e identificación de microorganismos.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GenLab del Perú  
[Internet].2018 Perú. [Citado 2018 Mayo 05], Disponible en URL:  
<https://genlabperu.com/>
2. FARMACOPEA DE ESTADOS UNIDOS - USP 40 NF 35  
Capitulo <1116> Control Microbiológico y Monitoreo de Ambientes de  
Procesamiento Aséptico.  
USP 40\USP 40 NF-35 Vol. I (pág. 1455 - 1469).pdf
3. H.Enrique Medina Reyna, W. Alfredo Jara Torres; Validación de un  
sistema de tratamiento de agua grado inyectable. [Internet].2003 Perú.  
[Citado 2018 Mayo 05] Disponible en URL:  
[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2607/Medina\\_rh.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2607/Medina_rh.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
4. Ministerio de salud – Dirección General de Medicamentos, Insumos y  
Drogas ALERTA DIGEMID N° 67-2007, Internet Lima – Perú, 2007  
[citado 2017 Oct 14], Disponible en URL:  
[http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Alertas/2007/ALERTA\\_67-07.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Alertas/2007/ALERTA_67-07.pdf)
5. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID)  
Alerta Digemid N 04-2018 Internet, Peru-2018 [citado 2018 Mar 10],  
Disponible en URL:  
[http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Alertas/2018/ALERTA\\_04-18.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Alertas/2018/ALERTA_04-18.pdf)

6. C. Gutiérrez Arcila; Validación del proceso de limpieza y sanitización de un área de envase de producción de vacunas biológicas. [Internet].2013 Mayo, Colombia. [Citado 2018 Abr 29], Disponible en URL:  
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11775/GutierrezArcilaJennyCarolina2013.pdf;sequence=1>
  
7. E. García Montoya; Pérez Lozano; Validación de los procesos de limpieza en la industria farmacéutica, mediante la aplicación del análisis de riesgo, seguridad toxicológica y UPLC. [Internet].2015 España [citado 2018 Abr 29] Disponible en URL:  
[http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/98040/1/Wafae%20Rezquellah\\_THESIS.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/98040/1/Wafae%20Rezquellah_THESIS.pdf)
  
8. M. Laura Morales Henríquez; Validación del procedimiento de limpieza del proceso de manufactura de caramelos de laboratorios elmor, s.a. [Internet].2010, Venezuela. [Citado 2018 Abr 29], Disponible en URL:  
<http://159.90.80.55/tesis/000147857.pdf>
  
9. Delgado, M. Escamilla, L. Pérez, A. Arias, J. Determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos estériles a base de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. [Internet].2004 Colombia. [Citado 2018 Mayo 05] Disponible en URL:  
[https://www.researchgate.net/publication/237035779\\_Determinacion\\_de\\_parametros\\_de\\_la\\_contaminacion\\_microbiana\\_presente\\_en\\_un\\_area\\_de\\_fabricacion\\_de\\_medicamentos\\_esteriles\\_a\\_base\\_de\\_antibioticos\\_ss-lactamicos](https://www.researchgate.net/publication/237035779_Determinacion_de_parametros_de_la_contaminacion_microbiana_presente_en_un_area_de_fabricacion_de_medicamentos_esteriles_a_base_de_antibioticos_ss-lactamicos)

10. Food and Drug Administration, FDA ALERTA: IPM HERIDA GEL EDWARDS PRODUCTOS FARMACEUTICOS, Internet, Peru-2017 [citado 2017 Oct 14], Disponible en URL:

<https://storymedical.top/alertas-fda/la-fda-alerta-ipm-herida-gel-por-edwards-productos-farmaceuticos-clase-de-recuerdo-contaminacion-microbiana/>

11. Food and Drug Administration, FDA ALERTA: Bella Pharmaceuticals, Inc. emite el retiro voluntario a nivel nacional de todos los productos farmacéuticos estériles debido a la falta de garantía de esterilidad. Internet, Peru-2017 [citado 2017 Oct 14], Disponible en URL:

<https://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm572373.htm>

12. Informes Técnicos de la OMS (823), Comité De Expertos de la OMS En Especificaciones Para Las Preparaciones Farmacéuticas - Informe 32, Ginebra – 1992. [Citado el 11 de junio 2018] 14], Disponible en URL:

<http://asesoriascablek.com/aiap/documentos/Informe%2032%20OMS.pdf>

13. Buenas prácticas de manufactura establecidas por la OMS para productos farmacéuticos estériles. Internet, Peru-1997 [citado 2017 Oct 14], Disponible en URL:

<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18835es/s18835es.pdf>

14. Manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos. Internet, Peru-1999 [citado 2017 Oct 25] Disponible en URL:

<http://bvcenadim.digemid.minsa.gob.pe/lildbi/textcomp/PUBDIGEMID0007.pdf>

15. ISO 14644 International Organization for Standardization junio, 24 de 2016[citado 2018 Mar 10], Disponible en URL:  
<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14644:-13:ed-1:v1:en>
  
16. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios – Guía de normas de correcta fabricación de medicamentos de uso humano y veterinario. Marzo 2009[citado 2018 Mar 10], Disponible en URL:  
[https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/anexos/14\\_anexo-1.pdf](https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/anexos/14_anexo-1.pdf)
  
17. FARMACOPEA DE ESTADOS UNIDOS - USP 40 NF 35  
Capitulo <1072> Desinfectantes y Antisepticos.  
USP 40\USP 40 NF-35 Vol. I (pág. 1317 - 1322).pdf
  
18. Héctor C, María Cristina F, Celina H, Mónica L, Graciela T, Esteban Z, Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéuticas cosmética y de productos médicos, Internet, Argentina. [Pág. 40] 401 [citado 2017 Oct 15], Disponible en URL:  
<http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>
  
19. Héctor C, María Cristina F, Celina H, Mónica L, Graciela T, Esteban Z, Manual de Microbiología aplicada a la industria Farmacéutica, Cosmética y de productos médicos, Internet, Argentina[Pág. 16] [citado 2017 Oct 15], Disponible en URL:  
<http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

20. Laboratorios Britania, agua peptonada bufferada, Internet, Argentina [citado 2017 Oct 15], Disponible en URL:  
[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a0f215585d61.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a0f215585d61.pdf)
  
21. Laboratorios Britania, caldo peptona lecitina polisorbato, Internet, Argentina [citado 2017 Oct 15], Disponible en URL:  
<http://www.britanialab.com/productos/B02230%20REV%2001-CDO%20DIG.%20CASEINA-SOYA-POLISOR.%2020.pdf>
  
22. Laboratorios Conda, Agar Soja Tripticaseina, Internet. España. Febrero 2014 [citado 2017 Oct 15], Disponible en URL:  
[https://www.condalab.com/uploads/media/1068\\_AGAR\\_SOJA\\_Y\\_TRIP\\_TICASEINA\\_\\_T.S.A\\_\\_REv\\_01\\_Febrero\\_2014\\_01.pdf](https://www.condalab.com/uploads/media/1068_AGAR_SOJA_Y_TRIP_TICASEINA__T.S.A__REv_01_Febrero_2014_01.pdf)
  
23. Laboratorios Britania, Agar Mac conkey, Internet, Argentina [citado 2018 Marzo 14], Disponible en URL:  
[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2ed674cf661.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed674cf661.pdf)
  
24. Laboratorios Britania, Cetrimida agar base, Internet, Argentina [citado 2018 Marzo 15], Disponible en URL:  
[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2ed5a58f4ee.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed5a58f4ee.pdf)
  
25. Laboratorios Britania, manitol salado agar, Internet Internet, Argentina [citado 2017 Oct 15], Disponible en URL:  
<http://www.britanialab.com/productos/B02118%20REV%2001-MANITOL%20SALADO%20AGAR.pdf>

26. FARMACOPEA DE ESTADOS UNIDOS - USP 40 NF 35  
Capítulo <61> EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTERILES: PRUEBAS DE RECuento MICROBIANO  
USP 40\USP 40 NF-35 Vol. I (pág. 126-127).pdf
  
27. Cabinas de Seguridad Biológica, Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. Washington, D.C.: OPS, ©2002. Biblioteca Sede OPS - Catalogación en la fuente. Organización Panamericana de la Salud. [Citado 2017 Oct 15], Disponible en URL:  
[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/desastres/lab-cabinas\\_biosecuridad\[1\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/desastres/lab-cabinas_biosecuridad[1].pdf)
  
28. Balanza analítica [Citado 2018 May 15], Disponible en URL:  
<https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/balanza-analitica.html>
  
29. Autoclave automática, [Citado 2018 May 15], Disponible en URL:  
[https://www.equposylaboratorio.com/sitio/contenidos\\_mo.php?it=1498#nolink](https://www.equposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1498#nolink)
  
30. Incubadora, [Citado 2018 May 15], Disponible en URL:  
<http://www.instrumentosdelaboratorio.net/2012/08/incubadora.html>
  
31. Micropipeta, [Citado 2018 May 15], Disponible en URL:  
<https://www.quiminet.com/articulos/diferentes-tipos-de-micropipetas-nichipet-4133849.htm>
  
32. Hisopo con punta de nylon [Citado 2018 May 15] Disponible en URL:  
<http://www.mbm.com.mx/t-Hisopo-nylon.php>

33. Hisopo Aplicador con punta de Algodón [Citado 2018 May 15], Disponible en URL: <https://www.alkhofarsac.com/producto/hisopo-aplicador-punta-algodon-no-esteril/>

34. FARMACOPEA DE ESTADOS UNIDOS - USP 40 NF 35  
Capitulo<1223> Validación de métodos microbiológicos alternativos  
USP 40\USP 40 NF-35 Vol. I (pág. 1927 - 1942).pdf

35. FARMACOPEA DE ESTADOS UNIDOS - USP 40 NF 35  
Capitulo<1225> Validación de métodos  
USP 40\USP 40 NF-35 Vol. I (pág. 1952 - 1958).pdf

## **XI. ANEXOS**

### **Anexo N° 1:** Certificados de Medios de Cultivo

- I. Certificado de Análisis Agar Tripticasa de Soya (TSA)
- II. Certificado de Análisis Caldo Peptona Lecitina Polisorbato (CPLP)

### **Anexo N° 2:** Certificados de Cepas Microbiológicas (Estándar Biológico)

- I. Certificado de Análisis Cepa Escherichia coli ATCC 8739
- II. Certificado de Análisis Cepa Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
- III. Certificado de Análisis Cepa Staphylococcus aureus ATCC 6538

### **Anexo N° 3:** Certificado de Hisopo Floqueado de Punta Regular

### **Anexo N° 4:** Certificados de Equipos Utilizados

- I. Certificado de Calibración del Potenciómetro Inolab
- II. Certificado de Calificación del Autoclave Laboklav

### **Anexo N° 5:** Reportes de Promoción de Crecimiento de Medios de Cultivos Utilizados

- I. Agar MacConckey (MC)
- II. Agar Manitol Salado (MAN)
- III. Agar Cetrimide (CET)
- IV. Bacto peptona (AP)
- V. Agar Tripticasa de Soya (TSA)
- VI. Manitol Salado Rojo Fenol (MAN)
- VII. Caldo Peptona de caseína Lecitina Polisorbato (CPLP)

### **Anexo N° 6:** Imágenes - Análisis de los Métodos Analíticos por hisopado

1. Material estéril para activación de Estándar biológico
2. Estándar biológico
3. Recuento microbiológico ATCC 6538
4. Recuento microbiológico ATCC 8739
5. Recuento microbiológico ATCC 9027

6. Método hisopo aplicador con punta de algodón – caldo peptona lecitina polisorbato
7. Placas Petri inoculadas
8. Método hisopo regular de plástico punta de nylon suave estéril floqueado y soluciones acompañantes\*
9. Método hisopo regular de plástico punta de nylon suave estéril floqueado – caldo peptona lecitina polisorbato
10. Método hisopo regular de plástico punta de nylon suave estéril floqueado – caldo peptona lecitina polisorbato –  
Lectura
11. Material incubado por tipo de método
12. Lectura de placas por tipo de ATCC 9027 – 8739 – 6538
13. Lectura de tubos por tipo de método
14. Agar macConkey – ATCC 8739
15. Agar manitol salado – ATCC 6538
16. Agar cetrimide – ATCC 9027

## **ANEXO N° 1**

## CERTIFICADOS DE MEDIOS DE CULTIVO

### I. CERTIFICADO DE ANÁLISIS AGAR TRIPTICASA DE SOYA (TSA)



## Certificate of Analysis

---

<b>Certificate of Analysis ID:</b>	<b>1054580500_VM755858_EN</b>
<b>Producer and client:</b>	<b>Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany</b>
<b>Test laboratory:</b>	<b>Merck KGaA Quality Control Microbiology SO-ABB-2 Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany</b>
<b>Sample identification:</b>	<b>GranuCult™ Tryptic Soy Agar acc. EP, USP, JP, ISO and FDA-BAM</b>
<b>Ordering number:</b>	<b>1.05458.0500</b>
<b>Lot number:</b>	<b>VM755858</b>
<b>Accreditation:</b>	The test laboratory of Merck KGaA is accredited by the German accreditation authority DAkkS as registered test laboratory D-PL-15185-01-00 according to DIN EN ISO/IEC 17025 for the performance testing of media for microbiology according to DIN EN ISO 11133:2014. 
<b>Test method:</b>	<b>Performance testing of solid culture media:</b> Quantitative method (spiral plater)
<b>Date of analysis:</b>	2016/10/14
<b>Date of release:</b>	2016/10/17
<b>Minimum shelf life:</b>	2021/09/19
<b>Composition (g/l):</b>	Pancreatic digest of casein 15.0; Papaic digest of soya bean 5.0; Sodium chloride 5.0; Agar agar 15.0.
<b>Preparation &amp; sterilization:</b>	Dissolve 40.0 g in 1 liter of purified water. Heat in boiling water and agitate frequently until completely dissolved. Autoclave (15 minutes at 121°C).
<b>Application:</b>	For the isolation and cultivation of a wide range of microorganisms from different material.
<b>Storage:</b>	Store at +15 °C to +25 °C, dry and tightly closed. Do not use clumped or discolored medium. Protect from UV light (including sun light).

**The reported results refer exclusively to the specified medium, see Certificate of Analysis ID.**

---

Merck KGaA · Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany: +49 6151 72-2440  
EMD Millipore Corp. · 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA +1-978-715-4321 1054580500 VM755858 EN



## Certificate of Analysis

Physical parameters	Specification	Lot value
Appearance (clarity):	clear	clear
Appearance (color):	yellowish-brown	yellowish-brown
pH-value (25 °C):	7.1 - 7.5	7.3
Solidification behaviour (2 h at 45 °C)	liquid	liquid
Stability test (color and hemolysis)	non hemolytic	non hemolytic

### Microbiological Performance

#### Quantitative method for solid media (spiral plater)

Test strain	Specification	Reference CFU	Test CFU	Recovery rate
Escherichia coli ATCC® 8739 [WDCM 00012]	≥ 70 %	163	137	84 %
Escherichia coli ATCC® 25922 [WDCM 00013]	≥ 70 %	122	113	93 %
Bacillus cereus ATCC® 11778 [WDCM 00001]	≥ 70 %	323	320	99 %
Listeria monocytogenes ATCC® 13932 [WDCM 00021]	≥ 70 %	284	276	97 %
Staphylococcus aureus ATCC® 25923 [WDCM 00034]	≥ 70 %	227	207	91 %

**Incubation:** 24 ± 3 hours at 37 ± 1 °C aerobic

**Reference medium:** Tryptic Soy Agar

A recovery rate of 70 % is equivalent to a productivity rate of 0.7.

The indicated colony counts result from the sum of a triple determination.

**All test methods listed above are according to DIN EN ISO 11133:2014.**



## Certificate of Analysis

Test strain	Specification	Reference 10 – 100 CFU	Test CFU	Recovery rate
Staphylococcus aureus* ATCC® 6538 [WDCM 00032]	≥ 70 %	70	69	99 %
Bacillus subtilis* ATCC® 6633 [WDCM 00003]	≥ 70 %	36	30	83 %
Escherichia coli* ATCC® 8739 [WDCM 00012]	≥ 70 %	50	47	94 %
Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027 [WDCM 00026]	≥ 70 %	58	53	91 %
Candida albicans* ATCC® 10231 [WDCM 00054]	≥ 70 %	39	37	95 %
Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404 [WDCM 00053]	≥ 50 %	25	22	88 %

**Incubation:** 24 hours at 30 – 35 °C aerobic, C.albicans and A.brasiliensis up to 5 days.

**Reference medium:** Blood Agar and SABOURAUD dextrose agar for C.albicans / A.brasiliensis

**Parameters marked with an asterisk have not been tested by an accredited method.**

**Signature:**

Dr. Stefanie Fischer  
Head of Quality Control Microbiology SO-ABB-2

**II. CERTIFICADO DE ANÁLISIS CALDO PEPTONA LECITINA  
POLISORBATO (CPLP)**



Certificate of Analysis

1.11723.0500 Casein-peptone lecithin polysorbate broth (base) for microbiology

Batch VM497123

	Spec. Values	Batch Values
Appearance (clearness)	clear to almost clear	almost clear
Appearance (colour)	yellowish	yellowish
pH-value (25 °C)	6.9 - 7.3	6.9

	Spec. Values	Batch Values
Growth (Staphylococcus aureus ATCC 6538 (WDCM 00032))	+	+
Growth (Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (WDCM 00026))	+	+
Growth (Bacillus subtilis ATCC 6633 (WDCM 00003))	+	+
Growth (Candida albicans ATCC 10231 (WDCM 00054))	+	+
Growth (Aspergillus brasiliensis (formerly A. niger) ATCC 16404 (WDCM 00053))	+	+

Incubation: 24 hrs.; 35 °C; aerobic;  
Aspergillus und C.albicans up to 3 days; 20 - 25 °C; aerobic.

Date of release (DD.MM.YYYY) 24.04.2013  
Expiry date (DD.MM.YYYY) 18.03.2018

Tobias Haas  
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.



**pronadisa**  
Micro & Molecular Biology

## QUALITY CONTROL CERTIFICATE

**PRODUCT:** MEAT PEPTONE  
**CAT N°:** 1600  
**LOT N°:** 250930  
**EXPIRY DATE:** 2018/09  
**QC Date:** 2014/09/25

We hereby certify that the above mentioned peptone has been approved by the Quality Control Laboratory.

TEST	Results	Specifications
Amino Nitrogen (AN)	3.6%	Minimum 3.4%
Total Nitrogen (TN)	12.3%	Minimum 10%
Loss on drying	3.3%	Maximum 6%
Ash (Residue on ignition)	8.3%	Maximum 15%
Reducing Sugars	NEGATIVE	NEGATIVE
Undigested Protein	NEGATIVE	NEGATIVE
Proteases	POSITIVE	POSITIVE
Nitrites	NEGATIVE	NEGATIVE
Tryptophan	POSITIVE	POSITIVE
pH (2% Solution)	6.9	6.5-7.5
GROWTH SUPPORTING PROPERTIES	Results	Specifications
Peptone Agar (USP)	SATISFACTORY	SATISFACTORY
Broth Formulations	SATISFACTORY	SATISFACTORY
MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS	Results Col/g	Specifications Col/g
Coliforms	NEGATIVE	NEGATIVE
Salmonella	NEGATIVE	NEGATIVE
Standard Plate Count	Less than 5000	Less than 5000
Molds and Yeast	Less than 100	Less than 100

**Laboratory result:** *Satisfactory*

Carmen Ramirez, QC Manager

1

**LABORATORIOS CONDA, S.A.**  
C/ La Forja, 9 · 28850 Torrejón de Ardoz (Madrid)  
Phone +34 91 761 02 00 · Fax +34 91 656 82 28

[www.condalab.com](http://www.condalab.com)

## **ANEXO N° 2**

# CERTIFICADOS DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS (ESTÁNDAR BIOLÓGICO)

## I. CERTIFICADO DE ANÁLISIS CEPA Escherichia coli ATCC 8739



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-617 Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value: 45 CFU per 0.1 ml	<b>Expiration Date:</b> 2018/11/30 <b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Tanner E Rothstein Release Date: 2017/2/2
--	---

<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, gray, mucoid, convex. <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod.	<b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive

  
 Amanda Kuperus  
 Quality Control Manager  
 AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.  
 Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.  
 Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark, and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



TESTING CERT #2655.01

(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303      Page 1 of 1      DOC.286

 **Microbiologics®**  
Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Escherichia coli  
Reference #: ATCC® 8739™\*  
Catalog #: 0483  
Lot #: 483-617  
Expiration Date: 2018/11/30  
Mean Assay Value: 45 CFU per 0.1 ml  
Standard Deviation: 5.4E+00  
Coefficient of Variation: 12%  
99% Confidence Interval of 4.2E+01 to 4.8E+01 CFU  
95% Confidence Interval of 4.3E+01 to 4.7E+03 CFU

Method used to determine Mean Assay Value: Spiral Biotech Test Method  
Medium Employed: TSA  
Incubation Time and Temp: 24 hrs at 34-38 degrees C

  
Amanda Kuperus  
Quality Control Manager  
AUTHORIZED SIGNATURE

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. The information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.  
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

## II. CERTIFICADO DE ANÁLISIS CEPA Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-815 Reference Number: ATCC® 9027™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value: 40 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2018/7/31 Release Information: Quality Control Technologist: Caitlyn J. Laudenbach Release Date: 2017/3/24
--	--

<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen. A second colony type may also be present as small, round, shiny colonies.	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Straight or slightly curved gram negative rod.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive Pseudomonas P Agar: positive (blue-green color diffusing into the agar) Growth at 42 C: positive  <div style="text-align: center;">                       Amanda Kuperus                      Quality Control Manager                      AUTHORIZED SIGNATURE                 </div>

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



TESTING CERT #2655.01

(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

 **Microbiologics®**  
Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa  
Reference #: ATCC® 9027™\*  
Catalog #: 0484  
Lot #: 484-815  
Expiration Date: 2018/7/31  
Mean Assay Value: 40 CFU per 0.1 ml  
Standard Deviation: 4.5E+00  
Coefficient of Variation: 11%  
99% Confidence Interval of 3.9E+01 to 4.2E+01 CFU  
95% Confidence Interval of 3.9E+01 to 4.2E+01 CFU

Method used to determine Mean Assay Value: Spiral Biotech Test Method  
Medium Employed: TSA  
Incubation Time and Temp: 24 hrs at 34-38 degrees C

  
Amanda Kuperus  
Quality Control Manager  
AUTHORIZED SIGNATURE

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. The information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.  
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

### III. CERTIFICADO DE ANÁLISIS CEPA Staphylococcus aureus ATCC 6538



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-527 Reference Number: ATCC® 6538™ Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value: 60 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2018/5/31 <b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Caitlyn J Laudenbach Release Date: 2017/5/18
--	--

<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)

<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
---	---

  
 Amanda Kuperus  
 Quality Control Manager  
 AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

 Microbiologics®  
Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus  
Reference #: ATCC® 6538™\*  
Catalog #: 0485  
Lot #: 485-527  
Expiration Date: 2018/5/31  
Mean Assay Value: 60 CFU per 0.1 ml  
Standard Deviation: 6.3E+00  
Coefficient of Variation: 11%  
99% Confidence Interval of 5.7E+01 to 6.2E+01 CFU  
95% Confidence Interval of 5.8E+01 to 6.2E+01 CFU

Method used to determine Mean Assay Value: Spiral Biotech Test Method  
Medium Employed: TSA  
Incubation Time and Temp: 24 hrs at 34-38 degrees C

  
Amanda Kuperus  
Quality Control Manager  
AUTHORIZED SIGNATURE

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. The information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.  
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

## **ANEXO N° 3**

## CERTIFICADO DE ANÁLISIS HISOPO FLOQUEADO DE PUNTA REGULAR



Jr. Cápac Yupanqui N° 2434, Lircas, Lima 14 PERU (Altura)  
 Cdra 8 Av. 2 de Mayo San Isidro  
 Telef. 203-7500 Telefax: (51-1) 203-7501.  
 e-mail: ventas@genlabperu.com , www.genlabperu.com

### ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Hisopo Floqueado de Punta Regular

#### Hisopo Floqueado de Punta Regular

<b>DESCRIPCIÓN</b>	Hisopo Floqueado estéril de punta regular; adecuado para toma de muestras ambientales con excelente recuperación de microorganismos.	
<b>PRESENTACION</b>	Caja x 1000 hisopos empacados individualmente.	
<b>MARCA</b>	Copan Diagnostics Inc.	CODIGO: 502C901
<b>PROCEDENCIA</b>	EE.UU.	
<b>DESCRIPCION TECNICA</b>	<p>La punta del aplicador se recubre con fibras cortas Nylon® que están dispuestas de una manera perpendicular.                      No tienen núcleo absorbente interno para dispersar y atrapar la muestra.                      Las fibras perpendiculares de Nylon® sirven como un cepillo suave y permiten mejorar la recolección de muestras de células.                      La acción capilar entre las hebras de fibra facilita la excelente recolección de la muestra.  <b>Diseño ergonómico y anatómico:</b> El diseño único mejora la comodidad del paciente y la muestra recogida.  <b>La elución rápida:</b> Libera de inmediato la muestra en medios líquidos.  <b>Cuantitativo:</b> Medible y coherente absorción, óptimo traslado de la muestra para una medición cuantitativa; mejora la sensibilidad del ensayo.  <b>Mejor recuperación de células:</b> Cómoda para la toma de muestras, tienen diseños anatómicos y un cepillo suave con el fin de captar rápidamente y eficazmente células.  <b>Soluciones personalizadas:</b> Se activa según los requisitos de personalización específica en términos de dinámica de flujo mejorada, rendimiento o analito diana.  <b>Aplicaciones multiplataforma:</b> Son compatibles con múltiples aplicaciones.                      Manufacturado en conformidad con la Clasificación para uso quirúrgicamente invasivo transitorio.                      Con lote y fecha de expira Impreso en el envase externo de cada hisopo.                      Manufacturado en cumplimiento con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ ISO 9001</li> <li>○ EC93/42</li> <li>○ ISO 13485</li> </ul> Distancia punto de corte (para Swab Tip): 80mm	



## **ANEXO N° 4**

# CERTIFICADOS DE EQUIPOS UTILIZADOS

## I. CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DEL POTENCIÓMETRO INOLAB



### SERVICIO DE ASEGURAMIENTO METROLÓGICO

#### CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N°: 46403-1104-CLS-2017

Expediente : 419-13113-2017  
 Página : 1 de 2  
 Fecha de emisión : 2017 - 01 - 20

1. SOLICITANTE :  
 DIRECCIÓN :
  
2. INSTRUMENTO DE MEDICIÓN : POTENCIÓMETRO  
 MARCA : WTW  
 N° DE SERIE : 14320815  
 MODELO : INOLAB PH-7310P  
 ALCANCE DE ESCALA : -2.0 a 20.0 pH ; -2.00 a 20.00 pH y -2.000 a 19.999 pH  
 DIVISIÓN DE ESCALA : 0,1 pH ; 0,01 pH y 0,005 pH  
 TIPO DE INDICACIÓN : DIGITAL  
 PROCEDENCIA : ALEMANIA  
 IDENTIFICACIÓN : CI-13694 / CCMB-023  
 UBICACIÓN : MICROBIOLOGIA

3. FECHA Y LUGAR DE MEDICIÓN  
 La calibración se realizó el día 20 de Enero del 2017

4. MÉTODO.  
 La calibración se realizó tomando como referencia la PC-020 "Procedimiento para la calibración de medidores de pH" del SNM-INDECOPI.

5. PATRÓN DE MEDICIÓN.

SUSTANCIA PATRÓN / 25°C	N° DE CERTIFICADO	TRAZABILIDAD
4,01 pH	11J21	SRM de NIST
7,01 pH	25J21	SRM de NIST
10,01 pH	01G54	SRM de NIST

INSTRUMENTO	MARCA	N° DE CERTIFICADO	TRAZABILIDAD
TERMÓMETRO DIGITAL	LUTRON	LT-750-2016	INACAL
BARÓMETRO	LUTRON	LFP-400-2016	INACAL
TERMOHIGRÓMETRO	LUTRON	LT-755-2016	INACAL

6. CONDICIONES AMBIENTALES.  
 La calibración se realizó bajo las siguientes condiciones ambientales:  
 Temperatura: 22,6 °C a 22,8 °C      Humedad Relativa: 56,1 % a 55,9 %  
 Presión atmosférica : 1005,1 mbar a 1005,1 mbar

7. OBSERVACIONES.
- Los resultados de las mediciones efectuadas se muestran en la página 02 del presente documento.
  - Para el cálculo de la incertidumbre de medición se utilizó un factor de cobertura k=2 que corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente 95 %.
  - Para mejores resultados, se realizó ajuste en los puntos pH 4,01 ; 7,01 y 10,01.
  - Con fines de identificación se colocó una etiqueta autoadhesiva de color verde con la indicación "CALIBRADO".
  - La periodicidad de la calibración depende del uso, mantenimiento y conservación del instrumento de medición.

César Toledo Baca  
 Gerencia Técnica



**PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE DOCUMENTO SIN AUTORIZACIÓN ESCRITA DE ADVANCED METROLOGY SAC**

Jr. Nte. Aristides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreces - Cercado de Lima, Lima - Perú    Telf.: 564-5937 / 564-2046 / 564-5244    Telefax: (511) 564-5492  
 RPM: # 677755    RPC: 963754100    Entel: 981167242    E-mail: ventas@ametrology.pe / www.ametrology.com

## II. CERTIFICADO DE CALIFICACIÓN DEL AUTOCLAVE LABOKLAV

DIVISION DE METROLOGIA	
 <p><b>Kossodo</b> el mejor EQUIPO para su laboratorio</p>	
<h1>Certificado de Calificación</h1> <h2>Qualification Certificate</h2>	
<b>N° KS16-0176-3</b>	
<b>Cliente:</b> Customer <b>Dirección:</b> Address <b>Objeto calificado:</b> Qualified object <b>Marca:</b> Brand <b>Modelo:</b> Model <b>Número de Serie:</b> Serial Number <b>Identificación:</b> Identification <b>Lugar de Calificación:</b> Place of Qualification <b>Orden de Trabajo:</b> Work Order <b>Fecha de Calificación:</b> Date of qualification <b>Fecha de Emisión:</b> Date of issue	Este Certificado de Calificación documenta la trazabilidad a patrones Nacionales o Internacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). KOSSODO S.A.C. - División de Metrología mantiene y calibra sus patrones de referencia para garantizar la cadena de trazabilidad de las mediciones que realiza, así mismo realiza certificaciones metrológicas a solicitud de los interesados y brinda asistencia técnica en temas relacionados al campo de la metrología en la industria peruana. Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados. This Certificate of Qualification documents the traceability to national or international standards, which realize the units of measurement according to the International System of Units (SI). KOSSODO S.A.C. - Metrology Division supports and calibrates his reference standards to guarantee the chain of traceability of the measurements realized, as well as the metrological certifications realize at the request of the interested parties and offers technical assistance in topics related to the metrology field in the Peruvian Industry. In order to assure the quality of measurements the user should be recalibrating his instruments at appropriate intervals.
<b>Objeto calificado:</b> AUTOCLAVE <b>Marca:</b> LABOKLAV <b>Modelo:</b> 80 - M ECO <b>Número de Serie:</b> 02154088 <b>Identificación:</b> 669636 <b>Lugar de Calificación:</b> Laboratorio de Microbiología - Sala de Esterilización <b>Orden de Trabajo:</b> OT-01600889 <b>Fecha de Calificación:</b> 2016-08-25 al 2016-08-26 <b>Fecha de Emisión:</b> 2016-08-29	
<b>CARACTERÍSTICAS DEL OBJETO CALIFICADO</b> Characteristics of the qualified object	
<b>Tipo de Indicador:</b> Digital Type of indicating device <b>Alcance de Escala:</b> No indica Scale range of indicating device <b>División mínima:</b> 0,1 °C Minimum division <b>Superficies internas:</b> 2 Internal layers <b>Temperatura de calificación:</b> 121 °C ± 2 °C Qualification temperature <b>MÉTODO DE CALIFICACIÓN</b> qualification Method	<b>Tipo de Selector:</b> Digital Type of set point device <b>Alcance de Escala:</b> 98 °C a 135 °C Scale range of setting device <b>División mínima:</b> 0,1 °C Minimum division <b>Carga utilizada (%):</b> 60% Used load (%)
	<b>Tipo de Manómetro:</b> Digital Gauge Type <b>Alcance de Escala:</b> No indica Scale range of setting device <b>División mínima:</b> 0,1 kPa Scale interval of setting device
La calificación se ha realizado mediante la determinación de la temperatura, por comparación directa tomando como referencia el procedimiento, PC-006 Procedimiento de Calibración de Autoclaves - SNM-INDECOPI, Segunda Edición. The rating was made by determining the temperature, by direct comparison with reference to the procedure, PC-006 Autoclaves Calibration Procedure - SNM-INDECOPI, Second Edition.	
Sello 	<b>Director de Metrología</b> Metrology Director  Ernesto Rodríguez Morón
	<b>Supervisor de Laboratorio</b> Laboratory Supervisor  Francisco Ramos Tito
Edición 02 - Marzo 2013 Prohíbida la reproducción total o parcial de este documento sin la autorización de Kossodo S.A.C. Este documento carece de validez sin sello y firmas correspondientes partial or total reproduction of this document is prohibited without authorization of Kossodo S.A.C. This document is not valid without the respective stamp and signature Oficina de Ventas: Jr. Chota 1161 - Lima - Perú   Teléfonos: (+ (51-1) 619-8400   Anexo 1401   E-mail: metrologia@kossodo.com   www.kossodo.com	

## **ANEXO N° 5**

# REPORTES DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

## I. AGAR MACCONCKEY (MC)

**VERIFICACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS**

NOMBRE : * <u>Agar MacConckey "MC"</u>					
MARCA : <u>Merck</u>		LOTE: <u>VM732265</u>			
FECHA DE INGRESO : <u>2017-02-20</u>			FECHA DE VENCIMIENTO : <u>2021-03-14</u>		
FECHA DE USO : <u>2017-05-31</u>			FECHA DE PREPARACION : <u>2017-11-06</u>		
LOTE DEL MEDIO PREPARADO: <u>MC 013-17</u>					
<b>PROMOCION DE CRECIMIENTO (PC)</b>					
ENSAYO: <u>PC Medio Sólido Selectivo</u>				FECHA DE ENSAYO: <u>2017-11-08</u>	

Microorganismo de Prueba	ATCC	Lote N°	Pasaje N°	Concentración (Ufc)	Propiedad
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	<u>485-527</u>	<u>3</u>	<u>34</u>	<u>Inhibitoria</u> <u>PC</u>
<i>Escherichia coli</i>	8739	<u>485-617</u>	<u>3</u>	<u>21</u>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027				
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633				
<i>Salmonella enterica</i>	14028				
<i>Candida Albicans</i>	10231				
<i>Aspergillus Niger</i>	16404				

**LECTURAS** FECHA DE LECTURA:

MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS *						MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS*	
ATCC	Recuento(ufc)	Promedio X	Recuento(ufc)	Promedio X	% Recuperación	Tiempo de Incubación 24h***	Tiempo Incubación 48h***
	<u>MC013-17</u>	<u>MC013-17</u>	<u>TSA029-17</u>	<u>TSA029-17</u>	<u>MC013/TSA029</u>		
6538	<u>0-0</u>	<u>0</u>	<u>31-36</u>	<u>34</u>	<u>0%</u>		
8739	<u>13-15</u>	<u>14</u>	<u>23-18</u>	<u>21</u>	<u>66.7%</u>		
9027							
6633							
14028							
10231							
16404							

\* Medios de Cultivo a verificar Ag. Tripticasu Soya Lote: TSA 029-17

\*\* Medio de cultivo de referencia: Ag. Tripticasu Soya Lote: TSA 029-17

\*\*\* Interpretación: (+): Crecimiento bacteriano, presencia de turbidez. (-): Crecimiento bacteriano negativo, no hay presencia de turbidez.

**RESULTADOS :**

CONFORME  NO CONFORME

**OBSERVACIONES :**

Realizado Por: [Firma] Fecha: 2017-11-10

## II. AGAR MANITOL SALADO (MAN)

### VERIFICACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

NOMBRE : * <u>Agar Manitol Salado</u>							
MARCA : <u>Mercu</u>	LOTE: <u>VY1574204</u>						
FECHA DE INGRESO : <u>2014-04-02</u>	FECHA DE VENCIMIENTO : <u>2018-09-12</u>						
FECHA DE USO : <u>2017-02-15</u>	FECHA DE PREPARACION : <u>2017-11-17</u>						
LOTE DEL MEDIO PREPARADO : <u>MAN012-17</u>							
PROMOCION DE CRECIMIENTO (PC)							
ENSAYO : <u>K</u>	FECHA DE ENSAYO : <u>2017-11-20</u>						
Microorganismo de Prueba	ATCC	Lote N°	Pasaje N°	Concentracion (Ufc)	Propiedad		
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	<u>485-572</u>	<u>3</u>	<u>46</u>	<u>PC</u>		
<i>Escherichia coli</i>	8739	<u>485-677</u>	<u>3</u>	<u>34</u>	<u>Inhibición</u>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027						
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633						
<i>Salmonella enterica</i>	14028						
<i>Candida Albicans</i>	10231						
<i>Aspergillus Niger</i>	16404						
LECTURAS							
MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS *				MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS*			
ATCC	Recuento(ufc)	Promedio X	Recuento(ufc)	Promedio X	% Recuperacion X <sub>1</sub> /X <sub>2</sub>	Tiempo de Incubacion 24h***	Tiempo Incubacion 48h***
	<u>MAN012-17</u>	<u>MAN012-17</u>	<u>TSA</u>				
6538	<u>20-14</u>	<u>14</u>	<u>48-44</u>	<u>46</u>	<u>37%</u>		
8739	<u>0-0</u>	<u>0</u>	<u>34-30</u>	<u>34</u>	<u>0</u>		
9027							
6633							
14028							
10231							
16404							
* Medios de Cultivo a verificar							
** Medio de cultivo de referencia: <u>Agar Tripticasa de Soya</u> Lote: <u>TS1032-17</u>						*** Interpretación: (+): Crecimiento bacteriano, presencia de turbidez, (-): Crecimiento bacteriano negativo, no hay presencia de turbidez.	
RESULTADOS :							
CONFORME <input checked="" type="checkbox"/>		NO CONFORME <input type="checkbox"/>					
OBSERVACIONES :							
Realizado Por : <u>[Firma]</u>				Fecha: <u>2017-11-22</u>			

### III. AGAR CETRIMIDE (CET)

#### VERIFICACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

NOMBRE: \* Agar Cetrimide "CET"  
 MARCA: Oxoid LOTE: VH41184  
 FECHA DE INGRESO: 2017-02-17 FECHA DE VENCIMIENTO: 2021-05-02  
 FECHA DE USO: 2017-07-18 FECHA DE PREPARACION: 2017-11-17  
 LOTE DEL MEDIO PREPARADO: CET03-17

INCE  
2017-11-20

PROMOCION DE CRECIMIENTO (PC)  
 ENSAYO: Admoción (Crecimiento) FECHA DE ENSAYO: 2017-11-20

Microorganismo de Prueba	ATCC	Lote N°	Pasaje N°	Concentración (Ufc)	Propiedad
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538				
<i>Escherichia coli</i>	8739	<u>483-617</u>	<u>3</u>	<u>34</u>	<u>Inhibitorio</u>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	<u>484-815</u>	<u>3</u>	<u>27</u>	
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633				
<i>Salmonella enterica</i>	14028				
<i>Candida Albicans</i>	10231				
<i>Aspergillus Niger</i>	16404				

LECTURAS FECHA DE LECTURA:

ATCC	MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS *				% Recuperación X <sub>1</sub> /X <sub>2</sub>	MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS*	
	Recuento(ufc)	Promedio X	Recuento(ufc)	Promedio X		Tiempo de incubación 24h***	Tiempo incubación 48h***
	<u>CET03-17</u>	<u>CET03-17</u>	<u>TSA032-17</u>	<u>TSA032-17</u>			
6538							
8739	<u>0-0</u>	<u>0</u>	<u>34-30</u>	<u>34</u>	<u>0</u>		
9027	<u>14-14</u>	<u>14</u>	<u>25-29</u>	<u>27</u>	<u>50%</u>		
6633							
14028							
10231							
16404							

\* Medios de Cultivo a verificar: Agar triptocase de Soya Lote: TSA032-17  
 \*\* Medio de cultivo de referencia: Agar triptocase de Soya Lote: TSA032-17  
 \*\*\* Interpretación: (+): Crecimiento bacteriano, presencia de turbidez; (-): Crecimiento bacteriano negativo, no hay presencia de turbidez.

RESULTADOS:  
 CONFORME  NO CONFORME

OBSERVACIONES:

Realizado Por: CP Ruiz Fecha: 2017-11-22

#### IV. BACTO PEPTONA (AP)

### VERIFICACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

NOMBRE : * <u>Bacto Peptona "AP"</u>							
MARCA : <u>Lab. Comda</u>		LOTE: <u>250930</u>					
FECHA DE INGRESO : <u>2016-07-04</u>				FECHA DE VENCIMIENTO : <u>2018-09</u>			
FECHA DE USO : <u>2017-04-27</u>				FECHA DE PREPARACION : <u>2017-11-06</u>			
LOTE DEL MEDIO PREPARADO: <u>AP 026-17</u>							
PROMOCION DE CRECIMIENTO (PC)							
ENSAYO: <u>PC</u>				FECHA DE ENSAYO: <u>2017-11-10</u>			
Microorganismo de Prueba	ATCC	Lote N°	Pasaje N°	Concentracion (Ufc)	Propiedad		
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	<u>485-527</u>	<u>3</u>	<u>37</u>	<u>PC</u>		
<i>Escherichia coli</i>	8739	<u>485-617</u>	<u>3</u>	<u>33</u>	<u>PC</u>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027						
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633						
<i>Salmonella enterica</i>	14028						
<i>Candida Albicans</i>	10231						
<i>Aspergillus Niger</i>	16404						
LECTURAS				FECHA DE LECTURA:			
MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS *				MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS*			
ATCC	Recuento(ufc)	Promedio X	Recuento(ufc)	Promedio X	% Recuperacion X / X	Tiempo de Incubacion 24h***	Tiempo Incubacion 48h***
6538						(+)	
8739						(+)	
9027							
6633							
14028							
10231							
16404							
* Medios de Cultivo a verificar: <u>Acar Multiplicada de Soya</u>							
** Medio de cultivo de referencia: <u>TSA 032-17</u>							
*** Interpretación: (+): Crecimiento bacteriano, presencia de turbidez. (-): Crecimiento bacteriano negativo, no hay presencia de turbidez.							
RESULTADOS:							
CONFORME <input checked="" type="checkbox"/>				NO CONFORME <input type="checkbox"/>			
OBSERVACIONES:							
Realizado Por: <u>J. Diaz</u>				Fecha: <u>2017-11-13</u>			

## V. AGAR TRIPTICASA DE SOYA (TSA)

### VERIFICACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

NOMBRE : \* Agar Tripticasa de Soya "TSA"  
 MARCA : Hercle LOTE: V71755858  
 FECHA DE INGRESO : 2017-02-17 FECHA DE VENCIMIENTO : 2021-09-17  
 FECHA DE USO : 2017-10-26 FECHA DE PREPARACION : 2017-11-08  
 LOTE DEL MEDIO PREPARADO: TSA 032-17

PROMOCION DE CRECIMIENTO (PC)  
 ENSAYO: PC / Medio Sólido FECHA DE ENSAYO: 2017-11-08

Microorganismo de Prueba	ATCC	Lote N°	Pasaje N°	Concentración (Ufc)	Propiedad
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	485-527	3	34	PC
<i>Escherichia coli</i>	8739	483-617	3	21	PC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	484-815	3	15	PC
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633	486-597	3	42	PC
<i>Salmonella enterica</i>	14028				
<i>Candida Albicans</i>	10231	443-696	3	33	PC
<i>Aspergillus Niger</i>	16404	392-667	3	14	PC

LECTURAS FECHA DE LECTURA:

ATCC	MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS *					MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS *	
	Recuento(ufc)	Promedio X	Recuento(ufc)	Promedio X	% Recuperación X / X	Tiempo de Incubación 24h***	Tiempo Incubación 48h***
	TSA032-17	TSA032-17	TSA029-17	TSA029-17			
6538	32-31	32	31-36	34	94.1%	/	
8739	32-33	33	23-18	21	157.1%		
9027	31-34	33	15-14	15	220%		
6633	41-43	42	44-40	42	100%		
14028							
10231	34-30	34	32-34	33	103%		
16404	17-19	18	11-16	14	128.6%		

\* Medios de Cultivo a verificar: Agar Tripticasa de Soya Lote: TSA 029-17  
 \*\* Medio de cultivo de referencia: Agar Tripticasa de Soya Lote: TSA 029-17  
 \*\*\* Interpretación: (+): Crecimiento bacteriano, presencia de turbidez, (-): Crecimiento bacteriano negativo, no hay presencia de turbidez.

RESULTADOS :  
 CONFORME  NO CONFORME

OBSERVACIONES :

Realizado Por: F. Diaz Fecha: 2017-11-10

## VI. MANITOL SALADO ROJO FENOL (MAN)

### VERIFICACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

NOMBRE : * <u>Manitol Salado Rojo Fenol "MAN"</u>							
MARCA : <u>MORSE</u>		LOTE: <u>VM401604</u>					
FECHA DE INGRESO : <u>13-06-04</u>			FECHA DE VENCIMIENTO : <u>2017-06-03</u>				
FECHA DE USO : <u>13-02-04</u>			FECHA DE PREPARACION : <u>16-07-21</u>				
LOTE DEL MEDIO PREPARADO: <u>MAV004</u>							
PROMOCION DE CRECIMIENTO (PC)							
ENSAYO: <u>PL Medio Sólido Selectivo</u>				FECHA DE ENSAYO: <u>16-07-21</u>			
Microorganismo de Prueba	ATCC	Lote N°	Pasaje N°	Concentración (Ufc)	Propiedad		
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	<u>485-294</u>	<u>3°</u>	<u>80</u>	<u>P.C</u>		
<i>Escherichia coli</i>	8739	<u>183-310</u>	<u>3°</u>	<u>112</u>	<u>P. Inhibidora</u>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027						
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633						
<i>Salmonella enterica</i>	14028						
<i>Candida Albicans</i>	10231						
<i>Aspergillus Niger</i>	16404						
LECTURAS				FECHA DE LECTURA:			
MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS *				MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS*			
ATCC	Recuento(ufc) * <u>MAN04</u>	Promedio X100 <u>04</u>	Recuento(ufc) ** <u>150</u> <u>02.6</u>	Promedio X100 <u>02.6</u>	% Recuperación <u>X</u> / <u>X</u>	Tiempo de Incubación 24h***	Tiempo Incubación 48h***
6538	<u>50-62</u>	<u>56</u>	<u>80-80</u>	<u>80</u>	<u>56/80 = 70%</u>		
8739	<u>0+0</u>	<u>0</u>	<u>114-112</u>	<u>112</u>	<u>0/112 = 0%</u>		
9027							
6633							
14028							
10231							
16404							
* Medios de Cultivo a verificar							
** Medio de cultivo de referencia: <u>Agar triptocase azul</u> Lote: <u>T30026</u>							
*** Interpretación: (+): Crecimiento bacteriano, presencia de turbidez. (-): Crecimiento bacteriano negativo, no hay presencia de turbidez.							
RESULTADOS:							
CONFORME <input checked="" type="checkbox"/>		NO CONFORME <input type="checkbox"/>					
OBSERVACIONES: <u>Nº de ensayos 3 de 3</u>							
Realizado Por:			Fecha:				
Supervisado Por:			Fecha:				

## VII. CALDO PEPTONA LECITINA POLISORBATO (CPLP)

### VERIFICACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

NOMBRE : * <u>CALDO Peptona de caseina lecitina polisorbato "cplp"</u>							
MARCA : <u>MERCK</u>		LOTE: <u>UN497123</u>					
FECHA DE INGRESO : <u>14-04-02</u>				FECHA DE VENCIMIENTO : <u>18-03-18</u>			
FECHA DE USO : <u>15-03-12</u>				FECHA DE PREPARACION : <u>16-06-28</u>			
LOTE DEL MEDIO PREPARADO: <u>CPLP 004</u>							
PROMOCION DE CRECIMIENTO (PC)							
ENSAYO: <u>PC MEDIO DUBIDO</u>				FECHA DE ENSAYO: <u>16-06-28</u>			
Microorganismo de Prueba	ATCC	Lote N°	Pasaje N°	Concentracion (Ufc)	Propiedad		
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	485-294	2°	44	PC		
<i>Escherichia coli</i>	8739	485-210	2°	54	PC		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027						
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633						
<i>Salmonella enterica</i>	14028						
<i>Candida Albicans</i>	10231						
<i>Aspergillus Niger</i>	16404						
LECTURAS							
MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS *				MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS*			
ATCC	Recuento(ufc)	Promedio X	Recuento(ufc)	Promedio X	% Recuperacion X <sub>1</sub> /X <sub>2</sub>	Tiempo de Incubacion 24h***	Tiempo Incubacion 48h***
6538						(+)	(+)
8739						(+)	(+)
9027						(+)	(+)
6633							
14028							
10231							
16404							
* Medios de Cultivo a verificar							
** Medio de cultivo de referencia: <u>Agar Inhibase soja</u> Lote: <u>TSD022</u>							
*** Interpretación: (+): Crecimiento bacteriano, presencia de turbidez, (-): Crecimiento bacteriano negativo, no hay presencia de turbidez.							
RESULTADOS :							
CONFORME <input checked="" type="checkbox"/>				NO CONFORME <input type="checkbox"/>			
OBSERVACIONES : <u>n° de empaques 3 de 3</u>							
Realizado Por :				Fecha:			
Supervisado Por:				Fecha:			

**ANEXO N° 6**

## IMÁGENES - ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR HISOPADO

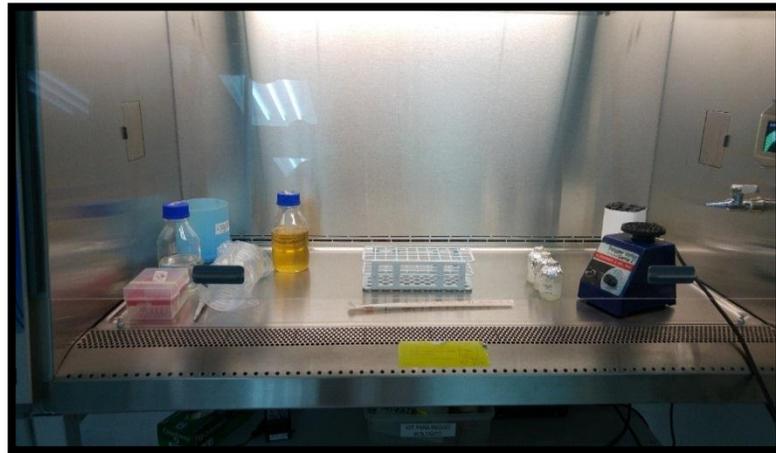


Imagen 1: Material estéril para activación de Estándar biológico



Imagen 2: Estándar biológico; (a) ATCC 6538 S.aureus dosada; (b) ATCC 8739 E.coli liofilizada.

I. LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION (50,100 Y 200 UFC / ML), POR TIPO DE MICROORGANISMOS DE TRABAJO

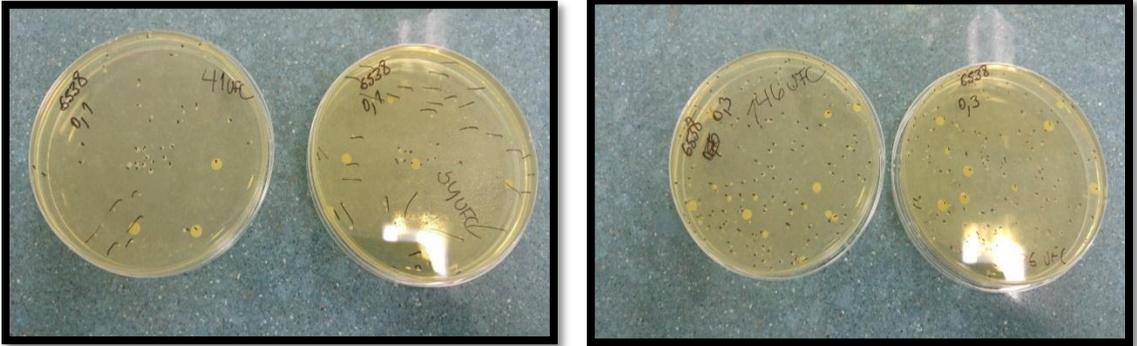


Imagen 3: Recuento microbiológico ATCC 6538 S.aureus; (a)  $\leq 50$  UFC (b)  $\leq 200$  UFC



Imagen 4: Recuento microbiológico ATCC 8739 E.coli; (a)  $\leq 50$  UFC (b)  $\leq 100$  UFC (c)  $\leq 200$  UFC

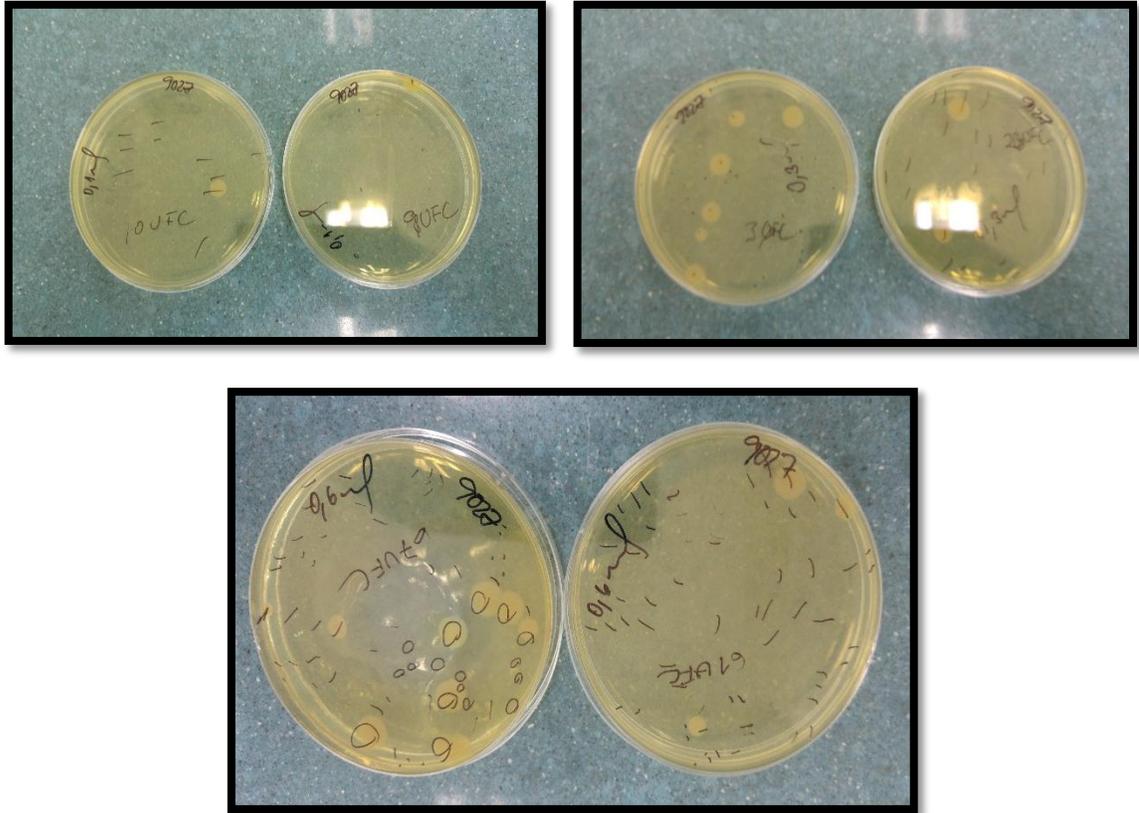
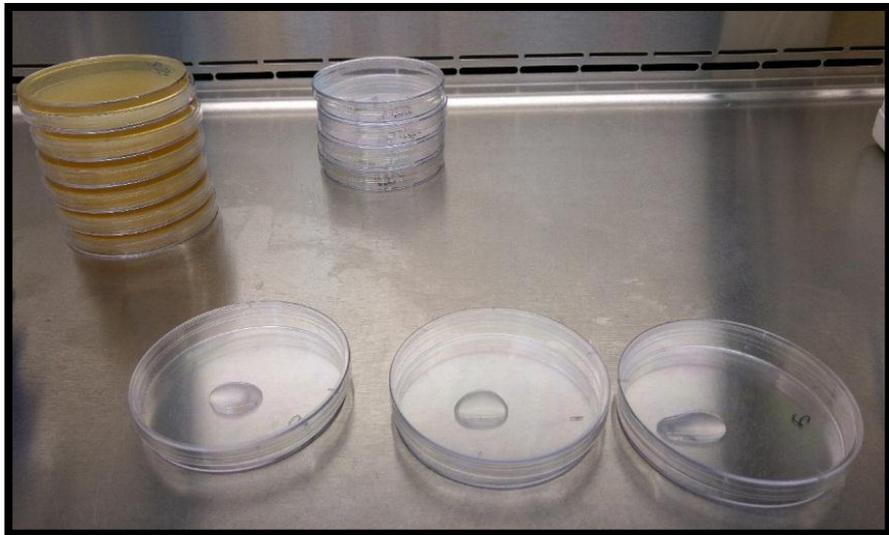


Imagen 5: Recuento microbiológico ATCC 9027 *P.aeruginosa*; (a)  $\leq 50$  UFC (b)  $\leq 100$  UFC (c)  $\leq 100$  UFC

**II. INOCULAR SOBRE SUPERFICIE SIMULADA (PLACAS PETRIS) CON AYUDA DEL MARCADOR (5 CM<sup>2</sup> X 5 CM<sup>2</sup>), MÉTODO: HISOPO APLICADOR CON PUNTA DE ALGODÓN + CALDO PEPTONA LECITINA POLISORBATO**

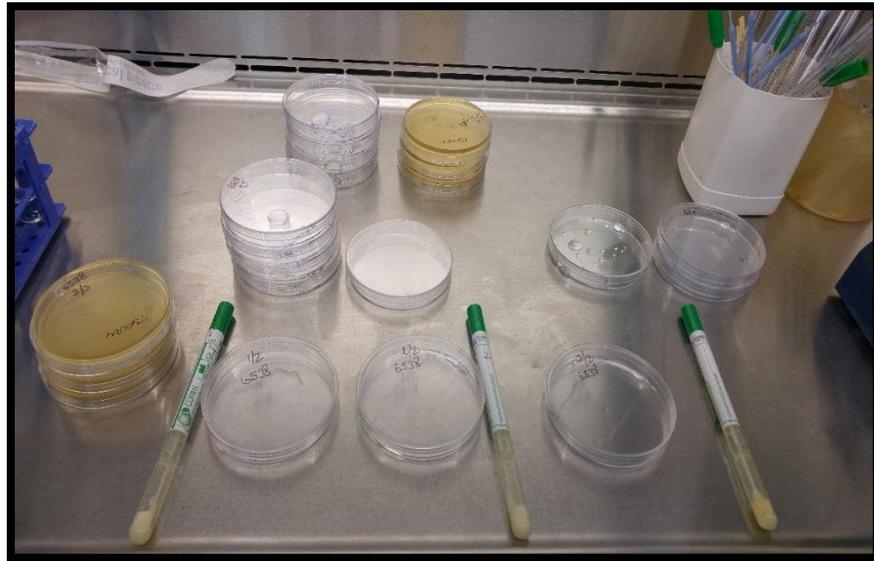
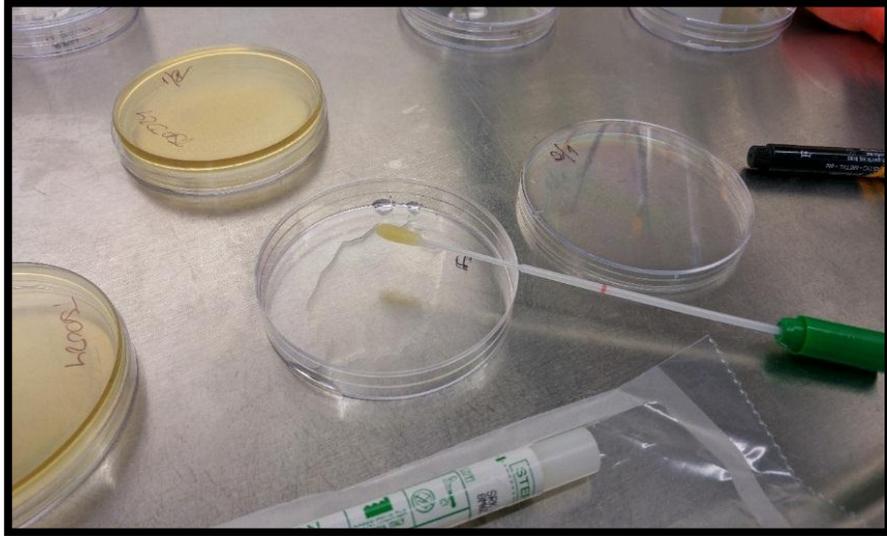


**Imagen 6:** Método hisopo aplicador con punta de algodón + caldo peptona lecitina polisorbato.



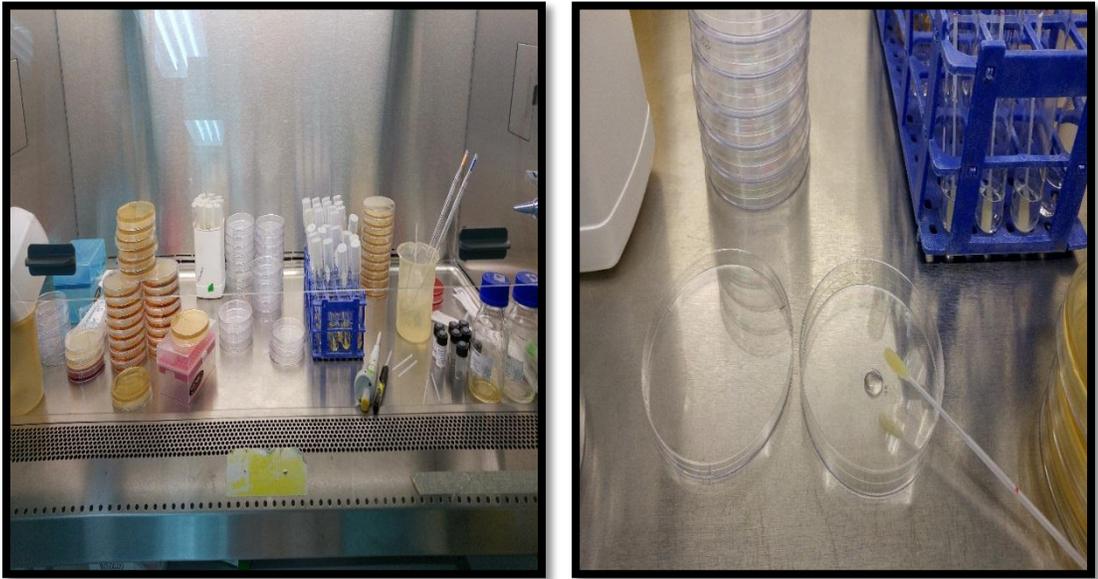
**Imagen 7:** Placas Petri inoculadas

- I. INOCULAR SOBRE LA SUPERFICIES SIMULADAS (PLACAS PETRIS) CON AYUDA DEL MARCADOR (5 CM2 X 5 CM2), MÉTODO: HISOPO REGULAR DE PLÁSTICO PUNTA DE NYLON SUAVE ESTÉRIL FLOQUEADO Y SOLUCIONES ACOMPAÑANTES \*

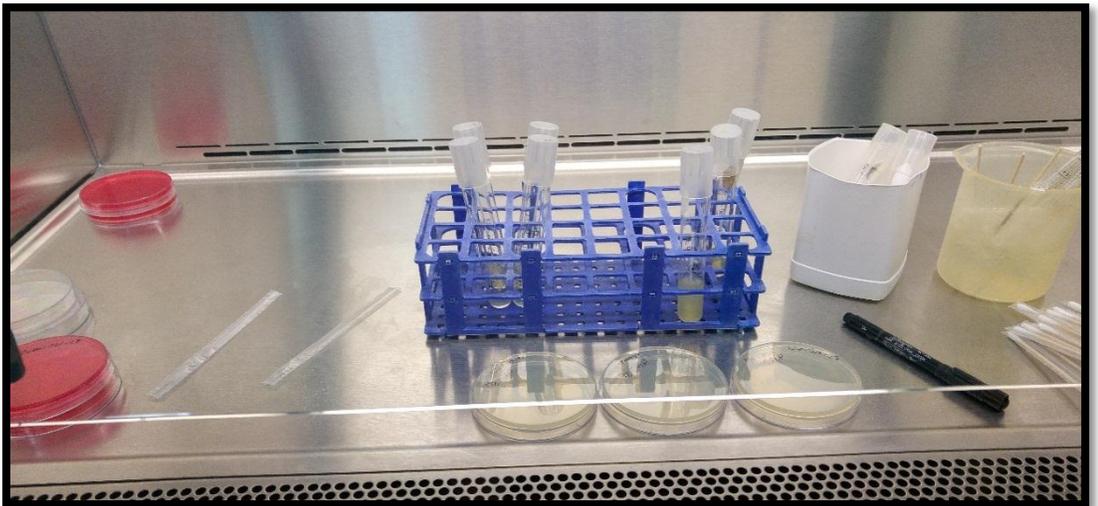


**Imagen 8:** Método hisopo regular de plástico punta de nylon suave estéril floqueado y soluciones acompañantes\* (a) directo; (b) indirecto.

**II. INOCULAR SOBRE LA SUPERFICIES SIMULADAS (PLACAS PETRIS) CON AYUDA DEL MARCADOR (5 CM2 X 5 CM2), MÉTODO: HISOPO REGULAR DE PLÁSTICO PUNTA DE NYLON SUAVE ESTÉRIL FLOQUEADO + SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CLORURO DE SODIO – PEPTONA E HISOPO REGULAR DE PLÁSTICO PUNTA DE NYLON SUAVE ESTÉRIL FLOQUEADO + CALDO PEPTONA LECITINA POLISORBATO**



**Imagen 9:** (a) Método Hisopo regular de plástico punta de nylon suave estéril floqueado + caldo peptona lecitina polisorbato (b) directo.



**Imagen 10:** (a) Método Hisopo regular de plástico punta de nylon suave estéril floqueado + caldo peptona lecitina polisorbato- Lectura

III. TODO EL MATERIAL TRABAJADO SERÁ INCUBADO Y LUEGO SE PROCEDE A SU LECTURA E IDENTIFICACIÓN



Imagen 11: Material incubado por tipo de método.

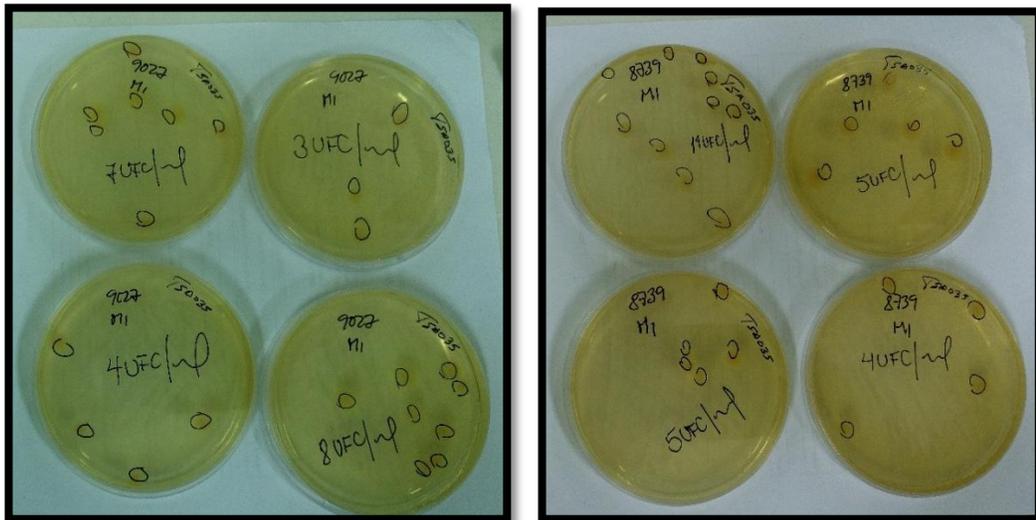


Imagen 12: Lectura de placas por tipo de ATCC (a) ATCC 9027 ; (b) ATCC 8739

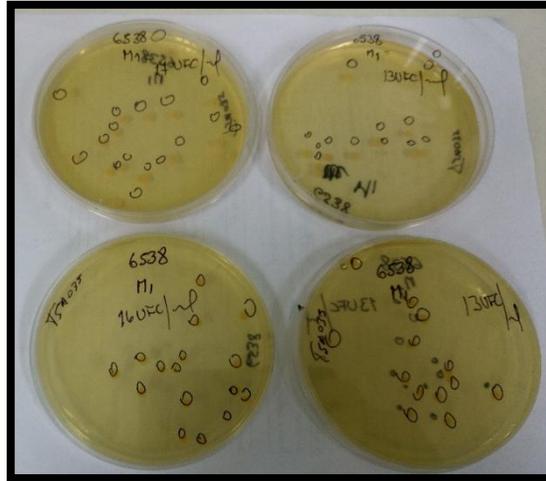


Imagen 12: Lectura de placas por tipo de ATCC (c) ATCC 6538

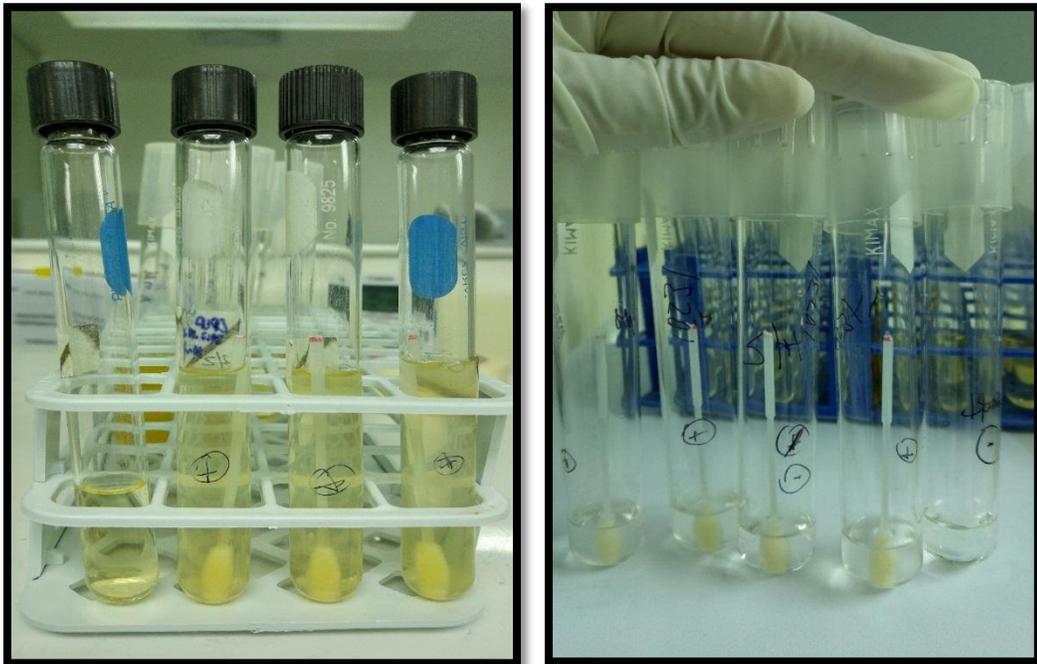


Imagen 13: Lectura de tubos por tipo de método

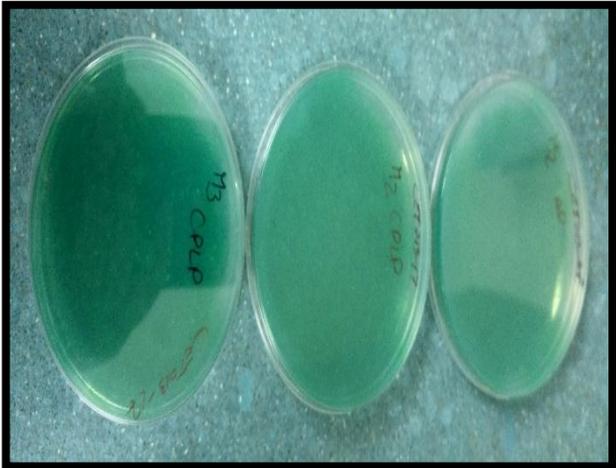
**IV. SELECTIVIDAD POR MÉTODO**



**Imagen 14:** Agar MacConkey - ATCC 8739.



**Imagen 15:** Agar manitol salado ATCC 6538



**Imagen 16:** Agar cetrimide – ATCC 9027