



**Universidad
Norbert Wiener**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**VALIDACIÓN DE APTITUD DEL MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DE RECuento Y
MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS PARA
SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIMA EN TABLETA
RECUBIERTA**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

Br. Simbron de la Cruz, Marco Ernesto
Br. Ysuhuilas Suárez, Elizabeth Maricarmen

Asesor:

Mg. Jaramillo Briceño, Marilú Ricardina

Lima – Perú

2020

Este trabajo se lo dedico a Dios, por darme las fuerzas necesarias cada día para poder alcanzar mis metas.

A mis padres, mamá Elisabeth y papá Manuel por su apoyo constante, sus consejos y su amor, sé que siempre estarán conmigo.

A mi hija, por ser mi motor y motivo desde que nació para jamás rendirme ante cualquier dificultad y poder darle lo mejor de mí.

A mi pareja Elisabeth, por estar siempre conmigo en la buenas y en las malas desde que la conocí.

A mis abuelitos, por estar siempre a mi lado y ser mi amuleto de la suerte en cada paso que doy.

Br. Simbron de la Cruz, Marco Ernesto

Este trabajo académico va dedicado a Dios, por darme la vida y las fuerzas necesarias para seguir adelante con mis objetivos y proyectos.

A mis padres, por su dedicación, amor, esfuerzo y apoyo; en especial a mi madre por toda su confianza puesta en mí para lograr mis objetivos estudiantiles y personales.

A mi hijo, por ser mi motor y motivo en esta etapa universitaria y en cada objetivo que trazo para poder darle lo mejor de mí.

A mi pareja Marco, por impulsarme de ser mejor profesional cada día y por caminar a mi lado desde que comenzamos nuestro amor. A mi abuelita María, que siempre he sentido sus cuidados, protección y su bendición desde el cielo.

Br. Ysuhailas Suárez, Elizabeth Maricarmen

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a la *Universidad Norbert Wiener*, en especial a nuestra Facultad de Farmacia y Bioquímica por brindarnos sus instalaciones, laboratorios e instrumentos de calidad para nuestro desarrollo profesional, como también a los docentes de calidad por sus enseñanzas, orientaciones y consejos profesionales.

Agradecer a nuestra asesora Mg. Marilú Ricardina Jaramillo Briceño por su orientación, paciencia, consejos y conocimientos para poder realizar este trabajo de investigación.

Br. Simbron de la Cruz, Marco Ernesto
Br. Ysuhailas Suárez, Elizabeth Maricarmen

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
- Situación problemática	3
- Marco teórico referencial	5
- Estudios antecedentes	14
- Importancia y justificación de la investigación	17
- Objetivo del estudio	18
- Hipótesis de investigación	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Enfoque y diseño	22
2.2. Población, muestra y muestreo	22
2.3. Variable (s) de estudio	23
2.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos	23
2.5. Proceso de recolección de datos	23
2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos	23
2.5.2. Aplicación de instrumento (s) de recolección de datos	24
2.6. Métodos de análisis estadístico	24
2.7. Aspectos bioéticos	24
III. RESULTADOS	25
IV. DISCUSIÓN	38
4.1. Discusión	38
4.2. Conclusiones	40
4.3. Recomendaciones	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Equipos y marcas de la investigación</i>	21
Tabla 2. <i>Reactivos y productos de la investigación</i>	22
Tabla 3. <i>Resultado de la estandarización de cepas en diluciones 10^{-5} a 10^{-7}</i>	26
Tabla 4. <i>Suspensión microbiana para uso 10 a 100 ufc/mL</i>	27
Tabla 5. <i>Promoción de crecimiento de medios utilizados en la estandarización</i>	28
Tabla 6. <i>Porcentaje de recuperación obtenido en los tres lotes de prueba de Sulfametoxazol + Trimetoprima tableta recubierta</i>	31
Tabla 7. <i>Promedio del crecimiento de los microorganismos obtenidos durante el tercer, quinto y séptimo día de análisis</i>	32
Tabla 8. <i>Resultado de la promoción de crecimiento utilizado en la validación de aptitud del método de recuento</i>	33
Tabla 9. <i>Resultado de microorganismo específicos utilizado en la Validación de aptitud del método de recuento para Sulfametoxazol + Trimetoprima tableta recubierta-Especificidad</i>	35
Tabla 10. <i>Medición de pH de la preparación de la muestra con el diluyente utilizado sados en la Validación de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol+Trimetorpima en Tableta Recubierta</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Esquema de Trimetoprima</i>	6
Figura 2. <i>Esquema de Sulfametoxazol</i>	7
Figura 3. <i>Proceso de estandarización de cepas</i>	11
Figura 4. <i>Estandarización de cepas</i>	12
Figura 5. <i>Aptitud de examen microbiológico de productos no estériles</i>	54
Figura 6. <i>Prueba para microorganismos específicos</i>	55

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. <i>Matriz de consistencia</i>	47
Anexo B. <i>Operacionalización de variables</i>	49
Anexo C. <i>Procedimientos en las pruebas</i>	50
Anexo D. <i>Formatos de validación</i>	56

RESUMEN

La presente tesis hizo referencia a dos combinaciones de Principio Activo que generan un sinergismo de potencia antimicrobiana frente a los distintos microorganismos de prueba. El **objetivo** fue desarrollar la Validación de Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol + Trimetoprima en Tableta Recubierta por los **métodos** de inoculación directa y filtración por membrana, de acuerdo a las normas oficiales de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42). Los **resultados** obtenidos por el método de inoculación directa, utilizando el medio del caldo neutralizante fue el más adecuado, debido que se observó un conteo de microorganismos más exacto y preciso en los tres lotes de prueba; los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos y se cumplen los requerimientos tanto para la aptitud, promoción de crecimiento y estandarización de cepas, por tanto, el examen microbiológico está también validado. En el método de filtración por membrana se obtuvo una recuperación limitada debido a la cantidad de sobrenadante generada por la muestra al diluirse con el medio de cultivo dando como resultado no apto para productos sólidos. En **conclusión:** El método de inoculación fue apto para los análisis de recuento y microorganismos específicos. Mientras que el método de filtración por membrana no fue el adecuado para la recuperación de microorganismos en tabletas recubiertas.

Palabras clave: Cepas, Aptitud del Método Microbiológico de Recuento, Microorganismos Específicos, Validación, Vertido en placa, Filtración por membrana.

ABSTRACT

The present thesis referred to two combinations of Active Principle that generate a synergism of antimicrobial potency against the different test microorganisms. The **objective** was to develop the Aptitude Validation of the Microbiological Method of Counting and Specific Microorganisms for Sulfamethoxazole + Trimethoprim in a Coated Tablet by the **methods** direct inoculation and membrane filtration, according to the official standards of the United States Pharmacopeia (USP 42). The **results** obtained by the direct inoculation method, using the neutralizing broth medium was the most appropriate, since a more accurate and precise count of microorganisms was observed in the three test batches; the results obtained are within the established parameters and the requirements for both aptitude, growth promotion and strain standardization are met, therefore, the microbiological examination is also validated. In the membrane filtration method, limited recovery was obtained due to the amount of supernatant generated by the sample when diluted with the culture medium, resulting in not suitable for solid products. In **conclusion**: The inoculation method was suitable for count and specific microorganism analyzes. While the membrane filtration method was not adequate for the recovery of microorganisms in coated tablets.

Keywords: Strains, Aptitude of the Microbiological Counting Method, Specific Microorganisms, Validation, Discharge on plate, Membrane filtration

I. INTRODUCCIÓN

La Industria Farmacéutica ha alcanzado un auge sobresaliente en el Perú y en el mundo, siendo uno de los contribuyentes económicos más resaltantes en el país. Asimismo, su influencia en los distintos sectores, sobre todo en salud, implica el cumplimiento de lineamientos, normas y procedimientos estandarizados por la autoridad competente, la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID) los cuales se encuentran especificados en la Ley N° 29459: Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios. (1) y de acuerdo al D.S. 016-2011-SA. (2)

En la Industria Farmacéutica, el área de control de calidad asegura el muestreo, el cumplimiento de los criterios de aceptación especificados para los ensayos, los procedimientos de liberación, así como la organización y documentación que aseguren que se llevan a cabo las pruebas necesarias para asegurar la calidad de los productos y permitiendo que sean liberados para la venta o distribución en condiciones óptimas, consistente con el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura y por consiguiente las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). (2)

Al respecto, en lo concerniente a los ensayos microbiológicos para productos no estériles, estos deben ceñirse a un método validado por el cual se asegura el cumplimiento de parámetros para cada producto en específico, de ahí la importancia de la validación del método de prueba, según las normas oficiales para la obtención de resultados confiables y reproducibles. (3)

Asimismo, el desarrollo de los análisis microbiológicos involucra, análisis cualitativos y análisis cuantitativos, cuya ejecución conlleva a la necesidad de asegurar la validación de prueba de aptitud del método microbiológico de recuento y el método de microorganismos específicos, nuevamente con la finalidad de obtener resultados exactos y precisos. (5)

El proceso debe cumplir con las consideraciones de una validación como son la calificación de los equipos, incluyendo la calificación de desempeño,

la validación del método analítico es la colección de pruebas documentadas de que un procedimiento analítico es apto para su uso previsto. El uso de un procedimiento validado con instrumentos analíticos calificados ofrece la confianza de que el procedimiento generará datos de prueba de calidad aceptable. El uso de instrumentos calificados en la validación contribuye a la confianza en la validez de los datos generados. (4)

Las instalaciones se sujetan a un plan de diseño de las condiciones de infraestructuras específicas, ya que las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) establecen las condiciones óptimas para la circulación de aire por hora en cada área del laboratorio, así como la limpieza de los sistemas de aire; en el caso de productos estériles se establecen 20 circulaciones de aire por hora como mínimo; además, de la calificación del área que asegura el cumplimiento de los límites de partículas viables y no viables, así como las presiones diferenciales especificadas, positiva o negativa a fin de evitar la contaminación, sea esta cruzada o por propagación. En particular, el área de microbiología cuenta con distintos equipos que cumplen las exigencias de calibración y calificación entre ellos; la balanza analítica, además equipos de temperatura como el horno, las incubadoras, el baño maría, a lo cual se suman la cabina de flujo laminar (horizontal o vertical), la cabina de bioseguridad y la autoclave, esta última para la esterilización de los distintos medios de cultivo y materiales como las pipetas y micro pipetas. (4)

Respecto al examen microbiológicos para productos no estériles, aplican dos métodos: inoculación directa y filtración por membrana, además de la realización previa de la prueba de promoción de crecimiento y la estandarización de cepas. Los agentes neutralizantes que la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42) nos brinda son lecitina, polisorbato, tiosulfato y tioglicolato, que son los más específicos para el proceso de validación de la aptitud del método de prueba, dichos neutralizantes se utilizarán siempre que se realicen las pruebas de recuento y la identificación de microorganismos específicos. (6), (7)

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42) señala el caldo digerido de caseína y soja, como también hace mención a los agentes neutralizantes, siendo implícito el aseguramiento de los análisis y la consecuente

investigación, por ende, esta validación del método analítico refiere a los agentes neutralizantes en el medio del caldo neutralizante que antagonicen los antibióticos presentes en la formulación del producto farmacéutico. La presente investigación se orienta a los cuatro neutralizantes más específicos antes referidos por USP 42, cumpliendo con el aseguramiento de la calidad del producto y con ello la recuperación de la cantidad próxima a la referencia establecida de 100 UFC. Además, se realiza la prueba de promoción de crecimiento con las cepas de referencia, con la finalidad de asegurar la eficiencia del medio de cultivo que se utilizará en los análisis para el producto de prueba. Precisamente el desarrollo de esta tesis confirmará que el método sea idóneo y permita la recuperación de la carga microbiana que eventualmente pudiera estar presente en los productos farmacéuticos por lo que su denominación es: Validación de Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol + Trimetoprima en Tableta Recubierta.

- Situación problemática

La combinación de los principios activos Sulfametoxazol+Trimetoprima configura una potencia antimicrobiana compuesta, por la actividad farmacológica de cada principio activo frente a distintos microorganismos de prueba. Esto implica que se deberá neutralizar dicha acción antibiótica a fin de recuperar los microorganismos de referencia que establece la Farmacopea Americana (USP 42), al tiempo que brinda especificaciones para corroborar y validar el método analítico a emplear definiendo que este sea recuento en placa o filtración por membrana. (8)

La validación de un método analítico es imprescindible y en este caso proporciona la evidencia para el examen microbiológico mediante el método de Recuento y la identificación de microorganismos específicos, para Sulfametoxazol + Trimetoprima brindando resultados confiables al permitir la recuperación de la cantidad ensayada de microorganismos de desafío, referidas por las farmacopeas vigentes no más de 100 unidades formadores de colonia (ufc) y por otro lado, se debe realizar la neutralización adecuada

de los principios activos a evaluar. (9)

Siendo que el Laboratorio *Pharmed Corporation* produce Sulfametoxazol + Trimetoprima tableta recubierta, es indispensable cumplir con el Examen Microbiológico y por ende se debe cumplir con el requisito de validar el método, esto es cumplir con la aptitud del método de recuento y el método de identificación de microorganismos específicos con base a los parámetros descritos en las normas oficiales, para el caso USP 42, tal que se asegure que dicho método sea exacto, confiable y preciso. Precisamente la investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio *Pharmed Corporation*, empresa farmacéutica certificada en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que cumple con las exigencias normativas sanitarias vigentes que aplican entre otros, a las instalaciones, control de materia prima y/o excipientes y uso de métodos analíticos validados.

El problema de la presente investigación involucra la forma farmacéutica tabletas, en particular, tabletas recubiertas, utilizando como norma técnica de referencia la farmacopea americana (USP 42). Considerando que los excipientes presentes en la formulación procuren evitar la contaminación, por esta razón se deben realizar pruebas analíticas idóneas que permitan conocer la calidad microbiológica del producto en cuestión. (10)

La presencia de los principios activos Sulfametoxazol + Trimetoprima, son antimicrobianos de amplio espectro que inhiben el crecimiento de distintos microorganismos patógenos; siendo así, es necesaria la neutralización de los principios activos para así recuperar los microorganismos de prueba implicados en la validación, lo cual asegurará su identificación, y permitirá contar con método que cumpla con los parámetros exigibles para su validación, garantizando el recuento microbiano, y la identificación que determine la ausencia o presencia de los microorganismos específicos. (10)

Resulta indispensable contar con un método analítico microbiológico validado que permita reportar el recuento de bacterias mesófilas aerobias (RTMA) y recuento total de hongos y levaduras (RTCHL) que eventualmente puedan desarrollarse en una muestra. (11)

¿Los métodos de recuento y de identificación de microorganismos específicos para Sulfametoxazol + Trimetoprima en tabletas recubiertas, son

reproducibles, exactos, confiables y precisos?

- Marco teórico referencial

a) Trimetoprima

Es una 2-4, diaminopirimidina, antimetabolito de la síntesis de ácido fólico. Inicialmente se usó a dosis tóxicas, pero luego se empleó en combinación con el sulfametoxazol. Es un fármaco bacteriostático. In vivo es activo frente a: cocos gram positivos (*Staphylococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*) y bacilos gram negativos, exceptuando; *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacteroides spp.* La mayoría de los anaerobios, *Treponema palladium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycoplasma sp* son resistentes. La resistencia es debido a la impermeabilidad de la pared celular, mutaciones, etc. El mecanismo más importante por su repercusión clínica es el debido a la presencia del plasma. (12)

Mecanismo de acción: Es la inhibición de la dihidrofolato-reductasa a tetrahidrofolato de bacterias y protozoos, con una sensibilidad 50,000-10,000 veces superior que la enzima de células humanas, resultando en la inhibición de la síntesis de AND y proteínas bacterianas.

Aplicaciones terapéuticas: Está indicada en el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas producidas por bacterias sensibles, a dosis de 100 mg cada 12 horas o 200 mg una vez al día durante diez días. No se indica en pacientes con hipersensibilidad al fármaco y en caso de anemia megaloblástica debida a déficit de folato. No se recomienda durante el embarazo, ni en los primeros meses de vida, debe controlarse cuando existe insuficiencia renal. Si el aclaramiento de creatinina es de 15-50 mL/min., la dosis debe reducirse a 50 mg cada 12 horas. (12)

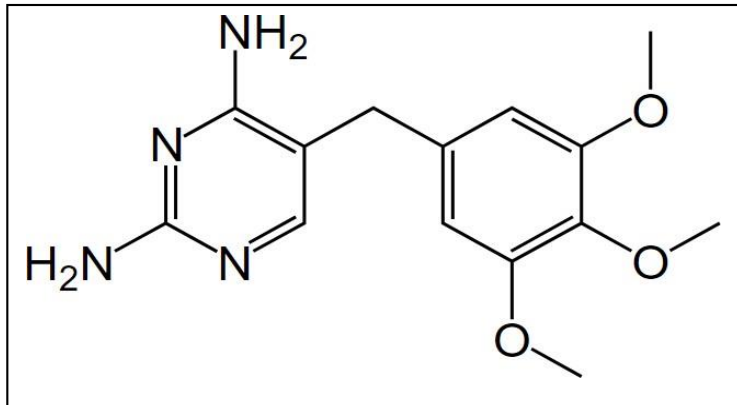


Figura 1. Esquema de Trimetoprima (12)

b) Sulfametoxazol

Químicamente es un derivado de la paraaminobenzenosulfonamida (sulfonamida), son insolubles en agua, pero sus sales se solubilizan con rapidez. Las sulfonamidas tienen un amplio rango de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, en los últimos años se han hecho comunes las cepas resistentes, disminuyendo la actividad de estos agentes en forma correspondiente. En general, las sulfonamidas sólo ejercen un efecto bacteriostático y los mecanismos de defensa celular y humoral del huésped son esenciales para la erradicación final de la infección. El sulfametoxazol es un congénere cercano sulfisoxazol, pero sus porcentajes de adsorción entérica y excreción urinaria son menores. (12)

Mecanismo de acción: Actúa sobre bacterias en crecimiento inhibiendo la síntesis de ácido fólico, por lo que producen un efecto bacteriostático. Por su analogía química con el ácido paraaminobenzoico (PABA), las sulfonamidas inhiben competitivamente la incorporación de PABA a la pterinida para formar el ácido tetraidropteroico; presentan gran afinidad por la tetraidropteroico-sintetasa. La presencia de PABA o tímida reduce la actividad antibacteriana, puesto que la acción inhibitoria es competitiva. El resultado de la disminución de nucleótidos con inhibición del crecimiento bacteriano. Se cree que también actúan inactivando otras enzimas, como deshidrogenasa o carboxilasa, produciendo una inhibición del metabolismo

intermediario bacteriano. El sulfametoxazol es activo contra *Chlamydia*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Mycobacterium leprae*, *Histoplasma capsulatum* y para *Coccidioides brasiliensis*. La sensibilidad varía la resistencia y las cepas. Los microorganismos más sensibles son: *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y *Nocardia*. (12)

Aplicaciones terapéuticas: El uso de los preparados de sulfonamidas está limitado por la alta prevalencia de resistencia que ha aparecido en microorganismos previamente susceptibles, las alternativas más seguras y la falta de eficiencia sistémica (preparados orales). Son de elección para el tratamiento de nocardiosis a dosis altas (6-8 g/días) durante 4-6 meses o más. Aunque no son los fármacos de elección, se pueden utilizar también en infecciones producidas por *Chlamydia*, *Haemophilus influenzae*, *dermatitis herpetiforme*, y en asociación con otros fármacos de infecciones por protozoos *plasmodium* y *Pneumocystis carinii*.

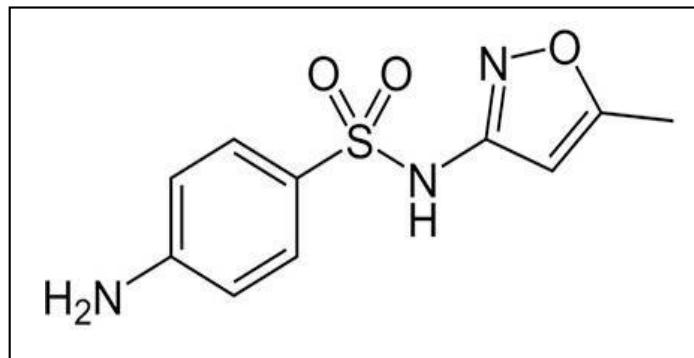


Figura 2. Esquema de Sulfametoxazol (12)

c) Procedimientos Microbiológicos y Requerimientos Implicados

Promoción de Crecimiento

Es una técnica microbiológica basada en asegurarnos que nuestro medio de cultivo cumpla con todas las especificaciones requeridas por el proveedor, también podemos confirmar su estabilidad, que se verifica generando distintos procedimientos y validaciones en el transcurso de tiempo de almacenamiento. Cabe resaltar que estos medios de cultivo cumplen un papel importante en la identificación específica de las cepas de

referencia por lo que su distribución y preparación deben ser adecuadas; de lo contrario, nos dará un falso positivo o un falso negativo durante el análisis. Las normas oficiales nos brindan con qué tipo de microorganismos debemos enfrentar cada medio de cultivo dependiendo de los resultados podemos darle el uso correcto para cada lote de medio de cultivo. (13), (14)

Eficacia antimicrobiana

Nos permite identificar exclusivamente los conservantes que tienen las distintas formas farmacéuticas. Las normas oficiales las clasifican dependiendo del tipo, el tiempo de análisis, la cantidad de microorganismos a identificar, entre otros, son factores influyentes en el cual cada analista deberá identificar en el tiempo descrito. Además, los conservantes antimicrobianos son sustancias agregadas a productos farmacéuticos acuosos. Las formas farmacéuticas no estériles pueden tener conservantes agregados para protegerlas del desarrollo de microorganismos introducidos inadvertidamente durante o después del proceso de fabricación. En el caso de artículos estériles envasados en envases multidosis, los conservantes antimicrobianos se agregan para inhibir el desarrollo de microorganismos que puedan introducirse por la extracción reiterada de dosis individuales. En todas las unidades multidosis estériles se espera encontrar uno o más conservantes antimicrobianos. (13), (15)

Los microorganismos de desafío se basan, generalmente, en los posibles contaminantes del producto farmacéutico teniendo en cuenta los atributos físicos, la formulación y el uso previsto. La serie de microorganismos de desafío estándar descrita en esta prueba no necesita prevenir la inclusión de otras especies, si se considera útil para medir la actividad biológica de los conservantes de un producto específico. (16)

Así, la efectividad de los excipientes se ve demostrado en esta prueba y es de suma confianza para que los productos no estériles cumplan su periodo de estabilidad siempre que no hayan sufrido cambios en el proceso de fabricación, análisis y/o envasado. (13)

Además, la Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos en presencia del producto es una prueba

microbiológica que nos permite recuperar aquellos microorganismos de desafío en un determinado tiempo y temperatura. Se prepararán diluciones seriadas, esto se lleva a cabo en una estandarización de cepas en el cual se requiere una cantidad de microorganismo viable en las cuales debemos inocular a un medio nutritivo o medio nutritivo más neutralizante. En el transcurso de los días se ve el crecimiento bacteriano que se debe recuperar entre 50 a 200 % UFC de la cantidad inoculada, por ende, esta prueba debe tener el mínimo de errores y el analista debe ser muy preciso en la preparación de medios, inoculación de cepa, ambiente de trabajo entre otros factores. Entonces, la prueba de aptitud nos garantiza la recuperación de los microorganismos estandarizados en el cual inactivamos el principio activo haciendo diluciones seriadas utilizando un neutralizante en especial o utilizando más de un neutralizante al mismo tiempo para favorecer el crecimiento y, en consecuencia, neutralizar el principio activo. (5), (13)

Prueba de recuento microbiano

Son pruebas microbiológicas en las que detectamos exclusivamente bacterias mesófitas y hongos de forma general que pueden desarrollarse en condiciones aeróbicas. Las pruebas han sido diseñadas principalmente para determinar si una sustancia o preparación cumple con una especificación establecida de calidad microbiológica. Si se emplea con tales propósitos deberá incluir el número de muestras a tomar e interpretar los resultados dependiendo para que se encuentre establecido. (13), (17)

Existen dos métodos básicos, recuento vertido en placa. Generalmente, se realiza a las muestras no estériles sólidas, semisólidas, óvulos entre otros. Además, su finalidad es detectar microorganismos aerobios, hongos y levaduras. Por otro lado, mencionamos la prueba filtración por membrana donde podemos identificar bacterias que son menores de 0,45 micras; ya que se realiza por un sistema de filtración estéril en el cual se necesita un equipo kitasato y por un sistema de vacío, aspirara la muestra y, por ende, las bacterias van a quedar en la parte superficial de la membrana de nylon de 0,45 micras para asegurarnos se realizará un método de enjuague que eliminará todo los posibles excipiente y restos que hayan quedado durante

la filtración. (13), (14)

Estandarización de cepas

En este tipo de método podemos recolectar ≤ 100 UFC/mL, para realizar las pruebas de promoción de crecimiento, aptitud de método, entre otros. Cabe resaltar que para realizar esta prueba se tiene que trabajar en condiciones asépticas con una buena distribución de aire y con una presión negativa que impida la salida de los distintos microorganismos que puedan contaminar el ambiente. La finalidad de la estandarización de cepas es llegar a una concentración en la que las normas oficiales aportan para poder llevar a cabo los distintos análisis microbiológicos.

Por ello, es de suma importancia saber que a más diluciones se va disminuyendo más la carga microbiana. Así, las normas oficiales nos dan un parámetro específico por cada dilución se debe considerar la disminución de un logaritmo. Las distintas metodologías pueden ser creadas por parte del analista siempre que siga las especificaciones. (13)

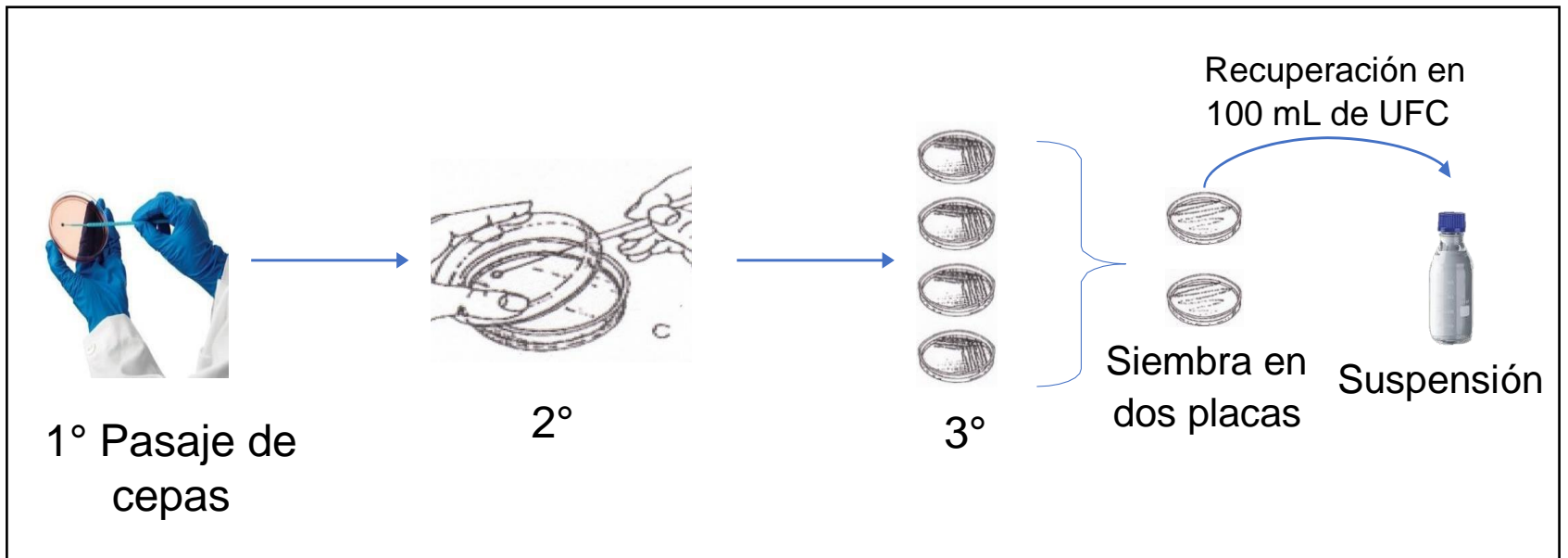


Figura 3. Proceso de estandarización de cepas

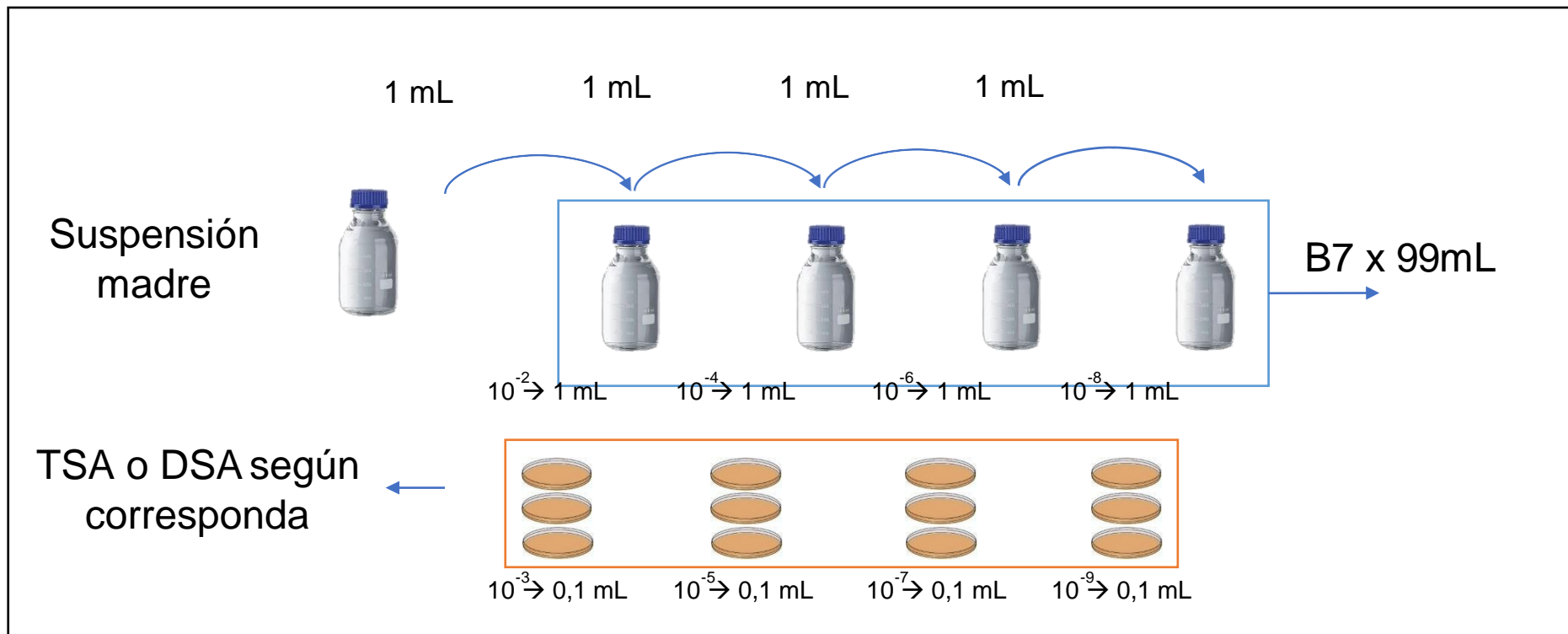


Figura 4. Estandarización de cepas

Leyenda:

TSA: Agar digerido de caseína de soya

DSA: Agar Sabouraud Dextrosa

B7: Buffer Fosfato Diluido pH 7.0

Medios de cultivo

Son medios específicos que tienen una amplia gama de diferentes proveedores, por ello, para este tipo de investigación solo se usarán medios líquidos enriquecidos. Por ejemplo: el caldo neutralizante, se trabajará con medios selectivos como agar manitol salado, agar cetrimide, agar XLD (xilosa, lisina, desoxicolato), agar mac conkey. (13), (18)

Cepas

Son microorganismo de referencia la cual son identificados por su ATCC y se utilizan como patrón en los análisis microbiológicos, también se utilizan para pruebas específicas como la calibración de cepas entre otras. En este tipo de investigación se utilizará siete cepas de referencia son: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231. (19)

Neutralizante

Según las normas de la Farmacopea de los Estados Unidos nos brinda distintos tipos de neutralizantes específicos que son de gran utilidad, pero para esta investigación utilizaremos cuatro: el tioglicolato, tiosulfato, lecitina y polisorbato. Estos en conjuntos nos ayudan a neutralizar los distintos excipientes y antibióticos que pueden interferir en el crecimiento microbiano y, por ende, nos dificulta la recuperación microbiana. Por otra parte, al tener una concentración de neutralizantes podemos trabajar directamente con la cantidad de microbianos que el producto puede contener, a fin de llegar a formular varias propuestas de investigación y llevar a cabo distintos análisis validados por expertos. (13)

Área de control de calidad

En los laboratorios el área de control de calidad debe estar separada de las áreas de manufactura y almacenamiento; por eso, deben contar con espacio e instalaciones para las pruebas y análisis que se realicen. A su vez, las áreas donde se ejecuten métodos de análisis (biológicos, microbiológicos o instrumentales) deben estar separadas entre sí y deben estar diseñadas para ajustarse a las funciones y operaciones que se conduzcan en ellas. (2), (20)

Además, el diseño del laboratorio se debe realizar atendiendo a requerimientos técnicos que faciliten el flujo de muestras, reactivos, personal, equipos, instrumentos y otros medios requeridos para el trabajo. Por ello, el laboratorio debe asegurar que las condiciones ambientales no invaliden los resultados o comprometan la calidad requerida de cualquier medición. (9), (21)

- Estudios antecedentes

Alejandro G. en el año 2018 realizó en Ecuador la tesis titulada “Control Microbiológico de Jarabes de Origen Natural para Trastornos Gastrointestinales, de la ciudad de Quito”. El **objetivo** fue identificar a los distintos microorganismos que pueden proliferarse dentro de las formas farmacéutica líquidas en este caso jarabes, cabe resaltar que existen varias fuentes de contaminación como el agua, la materia prima y las instalaciones de fabricación, en este caso se identificará algunos tipos de microorganismo como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* entre otros. **Método:** Utilizó el método de recuento o vertido en placa y aptitud del método. **Resultados:** En su resultado los jarabes de origen natural los resultados que obtuvieron de RTMA y RTCHL no cumplieron con las especificaciones de la USP 39 NF34 para productos no estériles acuosos. **Conclusión:** Dicho autor identificó el control microbiológico en los jarabes naturales para trastornos gastrointestinales no detectaron la presencia de *Escherichia coli*, como microorganismo específico en este tipo de forma farmacéutica. (22)

Vivas J. en el año 2015 se realizó la tesis titulada “Validación del Método de Recuento Microbiano y de Determinación de Microorganismos Específicos en productos Farmacéuticos No Estériles”. El **objetivo** fue validar el método de recuento microbiano y el método de determinación de microorganismos específicos para dos productos farmacéuticos no estériles elaborados por la empresa Biotech Laboratorios C.A. Método: utilizo el método de inoculación directa en la dilución 1/10 con el diluyente Caldo Lethen. **Resultado:** el método de recuento microbiano determinó la conformidad de ≤ 10 UFC/mL y para las suspensiones estandarizadas de los microorganismos específicos de prueba presento un recuento promedio más cercano al esperado de 100 UFC. **Conclusión:** el método para recuento microbiano y microorganismos específicos dieron conformes a las especificaciones de productos No Estériles de la monografía de la Farmacopea de los Estados Unidos. (23)

Morales M. en el año 2018 realizó la tesis titulada “Validación del Examen Microbiológico de Bicarbonato de sodio y Sulfazadiazina de plata según USP Vigente”. El **objetivo** fue desarrollar la validación del Examen Microbiológico del Bicarbonato de Sodio por el método de filtración y Sulfadiazina de Plata por el método de vertido en placa según USP vigente. **Método:** Utilizó dos métodos distintos, el de filtración por membrana y vertido en placa. **Resultados:** En sus resultados reporto que el método de vertido enplaca del producto no inhibió el crecimiento con la técnica empleada mientras que el método de filtración por membrana evidencio el crecimiento del microorganismo patógeno *Escherichia coli*. **Conclusión:** Dicho autor validó para sulfadiazina de plata el método vertido en placa y para el bicarbonato de sodio el método filtración por membrana en la cual obtuvieron un 50 a 200 % de recuperación microbiana y el crecimiento microorganismo de referencia según normalizadas en la USP vigente del capítulo general <61> y <62>, como también no hubo la necesidad de usar un neutralizantes. (24)

Terán R., Martínez J. en el año 2018 realizaron en Ecuador la tesis titulada “Control Microbiológico de Productos Naturales de uso Tópico con fines Cicatrizantes, Comercializados en Centros Naturistas y Mercado de la Ciudad de Quito”. El **Objetivo** fue identificar los distintos microorganismos de prueba frente a formas farmacéuticas tabletas, geles entre otros en las cual el criterio de aceptación y las pruebas generales de los distintos microorganismos son regidos por las USP. **Método:** Utilizaron el método de recuento, método de filtración por membrana y método del número más probable. **Resultados:** En sus resultados se identificaron que en la mayoría de sus muestras analizadas había presencia de *Candida albicans*, en las cuáles son criterios de aceptación para óvulos, mientras que el microorganismo más aislado fue *Bacillus Subtilis*, estos microorganismos de igual manera cumplieron el análisis de promoción de crecimiento y aptitud de método. **Conclusión:** Dicho autores controlaron microbiológicamente los productos naturales de uso tópico dando como resultado la ausencia de microorganismos patógenos que nos brinda las especificaciones en la USP. (25)

Sueros G. en el año 2013 se realizó la tesis titulada “Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel Intralaboratorial”. El **objetivo** fue validar un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial siguiendo las recomendaciones de la “United States Pharmacopea XXXIV” (USP 34). **Método:** Utilizo el método de inoculación directa en la dilución de 1/10 con el diluyente Caldo Trypticase de Soya más lecitina al 0,5 % más polisorbato 20 al 4%. **Resultado:** el método demostró que tiene la capacidad de detectar los microorganismos de prueba en presencia del diluyente, neutralizantes y producto con un porcentaje de recuperación mayor al 70 %. **Conclusión:** el método propuesto queda validado para el análisis microbiológico del producto farmacéutico Tyrex 27 mg/5mL de acuerdo con los resultados conformes de los parámetros recomendados por la USP 34. (26)

Parra L. en el año 2016 realizó en Chile, la tesis titulada “Validación de Metodología en Análisis Microbiológico de dos Formas Farmacéuticas Sólidas”. El **Objetivo** fue comprobar los métodos establecidos por la USP 38 en las cuales cumplen con las especificaciones previstas dentro del análisis cualitativo y cuantitativo. **Método:** Utilizó el método recuento en placa y filtración por membrana. **Resultado:** En sus resultados se comprobó el método por inoculación directa previsto que la muestra era sólida y en la cual obtuvieron mejor la identificación de los distintos microorganismos de prueba. **Conclusión:** Dicho autor validó el método por inoculación directa por que la muestra era sólida, en las cuales la obtuvieron mejor la identificación de los distintos microorganismos de prueba por lo tanto resulto la ausencia o presencia de las distintas cepas de referencia de aceptación regidos por la farmacopea (USP38). (27)

- Importancia y justificación de la investigación

La Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos es una prueba que se utiliza para garantizar la actividad del principio activo y de los excipientes. Estas pruebas deben cumplir especificaciones como la ausencia y/o presencia de distintos microorganismos tales como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*. Por ello, la farmacopea americana de los Estados Unidos nos brinda distintos medios de cultivos, sustancias neutralizantes de la actividad antibiótica y; por ende, se puede recuperar aproximadamente 100 ufc.

La Validación de la Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos lleva consigo varias etapas de análisis, pues las cepas de referencia deben cumplir ensayos de verificación y una calibración estandarizada para llegar a recuperar aproximadamente 100 ufc. Así, este parámetro de prueba es específico para la validación de los distintos métodos analíticos microbiológicos y se expresa de forma farmacéutica estéril o no estéril.

- Objetivo del estudio

Objetivo General: Validar el examen microbiológico de Sulfametoxazol + Trimetoprima tableta recubierta, mediante la aptitud del método de recuento e identificación de microorganismos específicos con arreglo a la USP 42.

Objetivo Específico:

- Evaluar la estandarización de las cepas de referencia requeridas para el método de recuento y de identificación de microorganismos específicos, a la concentración especificada por la USP 42.
- Evaluar el cumplimiento de promoción de crecimiento para los medios involucrados en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.
- Evaluar el cumplimiento del parámetro de precisión en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.
- Evaluar la aptitud de los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.
- Evaluar el cumplimiento del parámetro de exactitud en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.
- Evaluar el cumplimiento del parámetro de especificidad en el método de microorganismos específicos según la USP 42.
- Evaluar en tres lotes de producto los parámetros de precisión y exactitud que aplican a los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.

- Hipótesis de investigación

La validación del examen microbiológico de Sulfametoxazol + Trimetoprima tableta recubierta, mediante la aptitud del método de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple la USP 42.

- Hipótesis específica

- La estandarización de las cepas de referencia requeridas para el método de recuento e identificación de microorganismos específicos, a la concentración especificada cumple con la USP 42.
- La promoción de crecimiento para los medios involucrados en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple con la USP 42.
- El parámetro de precisión en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.
- La aptitud de los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple con la USP 42.
- El parámetro de exactitud en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple con la USP 42.
- El parámetro de especificidad en el método de microorganismos específicos cumple con la USP 42.
- La réplica en tres lotes de producto cumple con los parámetros de precisión y exactitud que aplican a los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se aplicó en el rubro de la microbiología en la validación de métodos de control de calidad en fármacos, utilizando los parámetros establecido en las normas oficiales. El diseño de la investigación estuvo basado en la normativa internacional USP 42 y en el desarrollo de aptitud de método correspondiente a los capítulos <61> y <62>; el desarrollo de validaciones, capítulo <1225>.

Por ello, en el proceso de investigación debemos verificar si algunos excipientes neutralizan o impiden la recuperación microbiana, por lo tanto, debemos utilizar los agentes neutralizantes que nos brinda la USP 42. También debemos determinar el tipo de antibiótico, es decir, la familia donde proviene, a fin de realizar una técnica confirmatoria y validada.

Los distintos antibióticos poseen, poder bactericida o bacteriostática que otras. Por ello, debemos neutralizar la actividad farmacológica para recuperar de forma parcial y consecutiva las colonias. Así como se observa en los capítulos <61>y <62> sin neutralizante. En esta investigación se trabajó con el medio del caldo neutralizante que posee los cuatro neutralizantes más específicos, como el polisorbato, la lecitina, el tioglicolato y el tiosulfato, así con estos tipos de inhibidores podemos obtener una mejor cantidad de colonias que deben mantenerse entre un 50 y 200% de UFC.

Asimismo, para los análisis de recuento microbiano se utilizaron dos métodos: inoculación directa o vertido en placa y filtración por membrana. El primer método es el más común, ya que solo se pesa 10 g de la muestra y se hace la homogenización correspondiente, la cantidad de sobrenadante que se almacena en algunos casos, en la parte inferior del frasco puede alterar algunos resultados, por eso, se recomienda hacer diluciones consecutivas para obtener una recuperación adecuada. Así, cabe resaltar que este proceso puede emplearse en otras formas farmacéuticas dependiendo de la solubilidad y del proceso de disolución, entre otros.

Además, el método directo nos brinda como resultado una cantidad específica de colonias. Todo dependerá del proceso de estandarización de cepas y la concentración del inóculo determinados en la validación de aptitud del método de recuento. Así, el método de filtración por membrana se usa un aparato de filtración diseñado para permitir la transferencia del filtro al medio, en donde se prepara la muestra empleando un método cuya aptitud se haya demostrado en la prueba de crecimiento y aptitud del método de recuento.

También para el método de filtración se debe utilizar 10 g de la muestra después realizar enjuagues repetitivos en los que se debe identificar la cantidad de colonias en la membrana de filtración, a fin de verificar que el caldo neutralizante no influya en el proceso de recuperación. Por ello, se debe realizar la promoción de crecimiento por lote de preparación de los medios de cultivo y verificar que no influya en los procesos de recuperación microbiana.

En la presente investigación se utilizaron los equipos e insumos disponibles en el laboratorio:

Tabla 1. Equipos y marcas de la investigación

Equipo	Marca
Incubadora (20°C-25°C)	Memmert
Incubadora (30°C-35°C)	Memmert
Horno de esterilización	Memmert
Baño María	Bionet
Balanza Analítica	Sonix Basis
Flujo Laminar	Science
Refrigeradora	Daewoo
pH metro	Metrohm
Autoclave	Nacional 45 L
Micropipeta (100-1000 µL)	Scilogex

Tabla 2. Reactivos y productos de la investigación

Reactivo / producto	Marca
Caldo Digerido Caseina y Soja	Conda
Caldo Macconkey	Conda
Caldo Rappaport	Conda
Caldo Neutralizante	Conda
Caldo Mossel	Conda
Agar Digerido Caseina y Soja	Conda
Agar Manitol Salado	Conda
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	Conda
Agar Macconkey	Conda
Agar Cetrimide	Conda
Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa	Conda
Agar Dextrosa de Sabouraud	Conda
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Microbiologics
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Microbiologics
<i>Salmonella entérica serovar tiphymurium</i> ATCC 14028	Microbiologics
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Microbiologics
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Microbiologics
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Microbiologics
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Microbiologics
Hidróxido de sodio 1 N	J.T Baker
Batería de coloración Gram	Liofilchem

2.1. Enfoque y diseño

El tipo de estudio es experimental, aplicado y cuali-cuantitativo.

2.2. Población, muestra y muestreo

La población 45 0000 tabletas recubiertas de Sulfametoxazol + Trimetoprima correspondientes a tres lotes. La muestra a utilizar será 120 tabletas recubiertas por cada lote.

Criterios de Inclusión

- Tablet as Recubiertas de Sulfametoxazol + Trimetoprima cuyo empaque este sellado.

Criterios de exclusión

- Tablet as Recubiertas Sulfametoxazol + Trimetoprima cuyo empaque este

deteriorado.

2.3. Variable (s) de estudio

Variable cuantitativa: Validación de Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol + Trimetoprima en Tableta Recubierta.

2.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos

Se utilizó una lista de cotejo validadas por expertos para recopilar datos obtenidos en el desarrollo de la investigación.

Además, se utilizaron las técnicas de vertido en placa y de filtración por membrana para el análisis de la Validación de Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol + Trimetoprima en tableta recubierta.

Asimismo, se utilizó la prueba de promoción de crecimiento para los medios de cultivo, de forma general, para los medios líquidos, sólidos y aquellos que contengan algún tipo de inhibidor. También se consideraron las pruebas de estandarización de cepas y la prueba del método de recuento y microorganismo específicos, tanto para la técnica de vertido en placa y filtración por membrana.

2.5. Proceso de recolección de datos

2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos

Se realizó la recolección de datos dependiendo de los resultados, sobre todo, del conteo de hongos y levaduras que son de cinco a siete días de incubación; además, estas lecturas se hacen de forma independiente para cada lote, y para cada método, es igual el procedimiento, al finalizar los cinco días se realizó la correspondiente lectura.

2.5.2. Aplicación de instrumento (s) de recolección de datos

Se empleará tres formatos para registrar los resultados obtenidos en el desarrollo experimental de la investigación previamente validado.

- Estandarización de Cepas de Prueba.
- Examen de Aptitud del Método de Recuento.
- Prueba de Promoción de Crecimiento.

2.6. Métodos de análisis estadístico

Se calculó las medidas de tendencia central y se presentaron los resultados consolidados en tablas. Además, se verificó en el mes de octubre la reactivación de las cepas y, de igual manera, en el mes de noviembre se registraron los resultados para las bacterias que se observaron en tres días y para hongos y levaduras en cinco días.

Así, los resultados para las pruebas de estandarización de cepas se verificaron de manera semanal, debido a que los tres análisis se realizaron en días consecutivos, el conteo de las colonias se realizó en las 24 y 48 horas; por ello, los resultados se leen y se reportan en el momento.

Además, para el caso de promoción de crecimiento, las lecturas se observan en el transcurso de 24 horas, para el caso de líquidos y agares en el transcurso de 48 horas mientras para el conteo se realizó dentro de las 48 horas, siendo estos datos obtenidos por cada lote de preparación.

2.7. Aspectos bioéticos

Se trabajará de acuerdo a las normas establecidas en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42).

III. RESULTADOS

En la Tabla 3 se observa la estandarización de cepas, en la cual es un método propio que cada analista debe considerar el modelo a trabajar siempre y cuando se cumplan los distintos lineamientos regidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42). En este caso se utilizaron las cepas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Así, para cada una de las cepas se utilizaron medios de cultivo en un tiempo de 48 horas de incubación; además, se realizó la reactivación correspondiente del pellet. Se dejó incubando por tres días, para el caso de las bacterias; cinco días, para el caso de los hongos en medio sólido Agar. Después para el caso de las bacterias y hongos se utilizó solución amortiguadora buffer 7 para poder obtener la mayor cantidad de cepa y realizar las distintas diluciones, a fin de llegar a obtener 100 UFC.

Por ello, se realizó diluciones consecutivas utilizando frascos con Buffer Fosfato Diluido pH 7,0 con un volumen de 99,0 mL por cada frasco. Además, estas diluciones fueron consecutivas para llegar a un recuento de 10 a 100 UFC, por ello, se realizó la dilución de 10^{-2} a 10^{-9} , sobre la que se ejecutó el plaqueo, inoculando 1 mL por placa de cada dilución, a fin de contabilizar las colonias y tener una disminución proporcional de las cepas de referencias. Este proceso se realizó tres veces para obtener una mejor trazabilidad y precisión. Las placas de tripticasa de caseína y soja utilizada para el caso de bacterias se incubaron por tres días a una temperatura de 30 a 35 °C, en cambio, para el caso de hongos y levaduras se utilizó agar sabouraud dextrosa y se incubo en un periodo aproximado de cinco a siete días a una temperatura 20 a 25 °C.

Tabla 3. Resultado de la estandarización de cepas en diluciones 10^{-5} a 10^{-7}

Cepa	Dilución	1° repetición		2° repetición		3° repetición		Promedio
		Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 3	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	10^{-6}	34ufc	32ufc	34ufc	24ufc	29ufc	31ufc	30.67ufc
<i>Candida albicans</i>	10^{-5}	345ufc	365ufc	378ufc	346ufc	321ufc	354ufc	351.50ufc
	10^{-6}	37ufc	45ufc	38ufc	36ufc	34ufc	37ufc	37.83ufc
	10^{-7}	2ufc	4ufc	3ufc	3ufc	2ufc	3ufc	2.83ufc
<i>Bacillus subtilis</i>	10^{-5}	548ufc	518ufc	529ufc	539ufc	526ufc	546ufc	534.33ufc
	10^{-6}	56ufc	52ufc	56ufc	57ufc	54ufc	57ufc	55.33ufc
	10^{-7}	4ufc	5ufc	6ufc	7ufc	3ufc	5ufc	5.00ufc
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^{-5}	897ufc	867ufc	824ufc	845ufc	846ufc	828ufc	851.17ufc
	10^{-6}	89ufc	91ufc	86ufc	98ufc	85ufc	83ufc	88.67ufc
	10^{-7}	5ufc	7ufc	9ufc	6ufc	5ufc	8ufc	6.67ufc
<i>Salmonella typhimurium</i>	10^{-5}	567ufc	532ufc	566ufc	543ufc	566ufc	546ufc	553.33ufc
	10^{-6}	56ufc	52ufc	56ufc	54ufc	54ufc	56ufc	54.67ufc
	10^{-7}	4ufc	5ufc	4ufc	3ufc	5ufc	3ufc	4.00ufc
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	10^{-5}	678ufc	678ufc	689ufc	645ufc	656ufc	689ufc	672.50ufc
	10^{-6}	66ufc	67ufc	69ufc	62ufc	64ufc	67ufc	65.83ufc
	10^{-7}	6ufc	5ufc	6ufc	6ufc	7ufc	4ufc	5.67ufc
<i>Escherichia coli</i>	10^{-5}	398ufc	378ufc	345ufc	367ufc	333ufc	356ufc	362.83ufc
	10^{-6}	38ufc	36ufc	34ufc	36ufc	32ufc	35ufc	35.17ufc
	10^{-7}	3ufc	2ufc	2ufc	2ufc	2ufc	2ufc	2.17ufc

Se llegó a estas diluciones indicadas en la tabla, dando como resultados a las especificaciones de la monografía (USP 42) de 10 a 100 unidades formadoras de colonias.

Tabla 4. Suspensión microbiana para uso 10 a 100 UFC/mL - Exactitud

Cepa	Dilución	1° repetición		2° repetición		3° repetición		Promedio
		Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 2	Placa 3	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	10 ⁻⁶	34ufc	32ufc	34ufc	24ufc	29ufc	31ufc	30.67ufc
<i>Candida albicans</i>	10 ⁻⁶	37ufc	45ufc	38ufc	36ufc	34ufc	37ufc	39.33ufc
<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁻⁶	56ufc	52ufc	56ufc	57ufc	54ufc	57ufc	55.67ufc
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁻⁶	89ufc	91ufc	86ufc	98ufc	85ufc	83ufc	87.44ufc
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 ⁻⁶	56ufc	52ufc	56ufc	54ufc	54ufc	56ufc	53.89ufc
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	10 ⁻⁶	66ufc	67ufc	69ufc	62ufc	64ufc	67ufc	65.67ufc
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁶	38ufc	36ufc	34ufc	36ufc	32ufc	35ufc	35.44ufc

En esta tabla la concentración de colonias de bacterias en la dilución de 10⁻⁶ será el patrón de trabajo de 10 a 100 UFC; en la cual se procederá aplicar para los siguientes ensayos: promoción de crecimiento y la prueba de aptitud del método de recuento y microorganismos específicos. Por otro lado, se observa que la concentración para hongos y levaduras, en el caso de *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans*, es de 10⁻⁶ como se visualiza en la Tabla 3.

Tabla 5. Promoción de crecimiento de los medios utilizados en la estandarización.

Medio de cultivo	LOTE:	Grupo	Cepas de prueba						Control negativo
			Tº: A o C			Tº: A o B			
			<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATC 9027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	
Agar tripticasa de caseína y soja	TSA 01	Prueba	38ufc	87ufc	68ufc	54ufc	38ufc	24ufc	-
		Control	40ufc	89ufc	68ufc	59ufc	36ufc	25ufc	
		% Recuperación	105%	102%	100%	109%	95%	104%	
	TSA 02	Prueba	42ufc	80ufc	64ufc	52ufc	41ufc	27ufc	-
		Control	43ufc	82ufc	59ufc	50ufc	42ufc	26ufc	
		% Recuperación	102%	103%	92%	96%	102%	96%	
	TSA 03	Prueba	35ufc	89ufc	66ufc	56ufc	34ufc	26ufc	-
		Control	33ufc	84ufc	61ufc	50ufc	32ufc	24ufc	
		% Recuperación	94%	94%	92%	89%	94%	92%	
Agar sabouraud dextrosa	DSA 01	Prueba	NA	NA	NA	NA	37ufc	28ufc	-
		Control	NA	NA	NA	NA	36ufc	29ufc	
		% Recuperación	NA	NA	NA	NA	97%	104%	
	DSA 02	Prueba	NA	NA	NA	NA	36ufc	26ufc	-
		Control	NA	NA	NA	NA	34ufc	25ufc	
		% Recuperación	NA	NA	NA	NA	94%	96%	
	DSA 03	Prueba	NA	NA	NA	NA	33ufc	24ufc	-
		Control	NA	NA	NA	NA	32ufc	24ufc	
		% Recuperación	NA	NA	NA	NA	97%	100%	

En esta tabla se indica el análisis de prueba, control, dando como resultado el % de recuperación indicado en la tabla de la cual está dentro de las especificaciones que indica la monografía (USP 42) de 50 a 200 % de unidad formadoras de colonias.

Leyenda:

ATCC: American Type Culture Collection

N.A.: No aplica

La prueba de promoción de crecimiento se realizó bajo las especificaciones establecidas por la USP 42 para cada uno de los medios de cultivo a utilizar. Así, se realizó la prueba de verificación para asegurar la eficacia del medio de cultivo. Para esto se debe realizar, en primer lugar, la prueba de estandarización de cepa y utilizar la dilución específica que contenga entre 10 a 100 UFC. Además, para el caso de los medios de cultivo líquidos se le inoculará la suspensión de prueba, según el microorganismo de referencia; para los agares se le inoculará a la placa estéril la suspensión de prueba y después se agregará el agar correspondiente por cada cepa de referencia, según el medio de cultivo a utilizar. Se ha de considerar que el conteo no debe ser menor al 50% ni mayor al 200% UFC comparado con la prueba control. Asimismo, esta prueba de promoción de crecimiento se realiza a cada medio de cultivo, tanto para agares y líquidos. La Farmacopea de los Estados Unidos nos brinda con qué tipo de microorganismos debemos enfrentarlos, la condición de incubación y el tiempo. Por ello, para tener una mejor trazabilidad y óptima calidad de medios se debe realizar por cada lote preparado y se debe incluir en su proceso de esterilización validado, un bioindicador específico que cumpla los parámetros estrictos para el proceso de calor húmedo. Así, en el caso de bioindicadores se debe colocar un control negativo para asegurar el proceso de esterilización.

Los medios que llevan algún tipo de neutralizante, como en el caso del caldo neutralizante se deben realizar pruebas confirmatorias, pruebas de promoción de crecimiento de forma general, es decir, enfrentarlo con las siete cepas de referencia que nos brinda la USP 42, a fin de recuperar la mayor cantidad de colonias. De la misma manera se deben realizar pruebas confirmatorias para poder visualizar si hubo algún cambio o mutación en las cepas de referencia.

Además, en el proceso de incubación, el tiempo para aquellos caldos que poseen algún inhibidor deben ser los mismos que se utilizan para el caldo de tripticasa de caseína y soja. Entonces, todo el medio de cultivo debe prepararse en ambientes asépticos que cumplan las especificaciones en infraestructura. También se debe utilizar agua purificada, estéril o cualquier tipo de agua que nos brinda el proveedor, las balanzas deben cumplir un tipo de calificación y la calibración, generalmente, se debe realizar forma anual.

Así, se inóculo la concentración de 10^{-6} , tanto para bacterias y hongos, es decir, la cantidad de 10 a 100 UFC/mL para los caldos incluyendo el caldo neutralizante. Esto se incubo a una temperatura de 30°C a 35°C para bacterias en un tiempo promedio de 24 horas, para hongos y levaduras de 20°C a 25°C en un tiempo promedio de 48 horas evidenciando resultados óptimos y visibles. Finalmente, para el caso de agares se le estrió la misma concentración de trabajo y se incubo de 30°C a 35°C en un tiempo promedio de 24 horas.

Además, se observó que para el caldo neutralizante que fue sometido a las mismas pruebas, los resultados fueron óptimos y no hubo variedad en el momento de la recuperación microbiana. Por ello, cabe resaltar que la promoción de crecimiento ayuda a que los resultados sean confiables y precisos, esto logra que las técnicas como vertido en placa y filtración por membrana produzcan resultados de calidad.

Así, este proceso se aplica de manera independiente; ya que los distintos laboratorios tienen un parámetro particular para obtener una concentración específica, el volumen de solución salina o buffer fosfato diluido pH 7,0 puede ser diferente, pero tiene que ser la misma cantidad para todos los frascos, a fin de que las diluciones consecutivas y la carga microbiana alcancen el descenso de forma parcial y lograr obtener la concentración en una dilución específica. Así, el conteo de las distintas colonias se puede dar de forma manual o por instrumentos automatizados, como un contador de colonias que permitirá obtener resultados de manera más rápida y específica, siendo exactos en sus resultados.

Por ello, al final del proceso se optó por la dilución que se obtenga 10-100 UFC/mL a fin de conseguir y procesar la validación correspondiente.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación obtenido en los tres lotes de prueba de Sulfametoxazol + Trimetoprima Tableta Recubierta

Medio de cultivo	Grupo	Lote	Cepas de prueba						
			<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATC 9027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
TSA	Primer lote	Prueba	36	56	89	31	58	35	25
		Control	35	55	91	33	54	37	24
		Promedio	35,5	55,5	90	32	56	36	24,5
		% Recuperación	97%	98%	102%	106%	93%	106%	96%
DSA	Primer lote	Prueba	34	55	87	26	55	33	19
		Control	33	57	88	28	51	34	18
		Promedio	33,5	56	87,5	27	53	33,5	18,5
		% Recuperación	97%	104%	101%	108%	93%	103%	95%
TSA	Segundo lote	Prueba	34	57	80	35	59	34	16
		Control	36	55	79	37	61	36	15
		Promedio	35	56	79,5	36	60	35	15,5
		% Recuperación	106%	96%	99%	106%	103%	106%	94%
DSA	Segundo lote	Prueba	33	55	81	25	52	35	18
		Control	32	54	83	27	54	37	17
		Promedio	32,5	54,5	82	26	53	36	17,5
		% Recuperación	97%	98%	102%	108%	104%	106%	94%
TSA	Tercer lote	Prueba	35	55	82	31	56	31	21
		Control	33	53	79	29	54	28	22
		Promedio	34	54	80,5	30	55	29,5	21,5
		% Recuperación	94%	96%	96%	94%	96%	90%	105%
DSA	Tercer lote	Prueba	31	58	77	31	50	34	22
		Control	29	54	73	29	48	31	23
		Promedio	30	56	75	30	49	32,5	22,5
		% Recuperación	94%	93%	95%	94%	96%	91%	105%

En esta tabla se observa el resultado del grupo de prueba y control, el porcentaje de recuperación frente a los tres lotes de Sulfametoxazol+Trimetoprima en tableta recubierta en la cual procede su recuperación frente al grupo de prueba.

Tabla 7. Promedio del crecimiento de los microorganismos obtenidos durante el tercer, quinto y séptimo día de análisis-Exactitud.

Cepa	Medio de cultivo	Grupo	1° Lote						2° Lote						3° Lote						Promedio	
			3° día		5° día		7° día		3° día		5° día		7° día		3° día		5° día		7° día			
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2		
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	DSA	PLACA																				
		Prueba	14	15	18	20	20	20	12	14	17	18	21	20	18	17	21	20	21	20		18
		Control	13	14	16	17	16	18	11	10	17	16	22	21	16	26	20	19	21	20		17
<i>Candida albicans</i>	DSA	Prueba	32	31	45	46	56	58	23	25	35	37	56	57	21	19	24	26	54	55		39
		Control	31	30	44	43	56	59	21	26	33	35	58	54	20	17	26	24	53	52		38
<i>Bacillus subtilis</i>	TSA	Prueba	23	22	45	46	58	59	23	23	45	44	61	58	22	25	35	39	58	54		41
		Control	22	21	44	44	56	57	22	21	44	43	60	57	21	24	34	37	56	54		40
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA	Prueba	44	45	44	57	82	88	43	44	56	57	89	82	46	44	56	55	87	89		62
		Control	43	44	43	56	80	87	42	43	55	58	85	91	43	42	54	53	85	88		61
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TSA	Prueba	45	44	56	58	68	70	43	42	55	52	67	63	42	41	58	53	67	71		55
		Control	44	43	54	56	65	65	42	41	53	50	66	61	41	38	55	51	59	69		53

Se observa un mínimo aumento de microorganismo en los distintos días de incubación por lo tanto estos resultados no difieren en los ensayos de la prueba de aptitud del método de recuento y microorganismos específicos.

Tabla 8. Resultado de la promoción de crecimiento utilizado en la Validación de Aptitud del Método de Recuento para Sulfametoxazol + Trimetoprima en Tableta Recubierta.

Medio de cultivo	Lote	Grupo	Cepas de Prueba				
			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATC 9027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
TSA	Primer lote	Prueba	78	32	66	NA	NA
		Control	76	29	59	NA	NA
		%Recuperación	103%	110%	112%	NA	NA
	Segundo lote	Prueba	77	45	65	NA	NA
		Control	75	44	64	NA	NA
		% Recuperación	103%	102%	102%	NA	NA
	Tercer lote	Prueba	88	44	56	NA	NA
		Control	87	43	54	NA	NA
		% Recuperación	101%	102%	104%	NA	NA
DSA	Primer lote	Prueba	NA	NA	NA	41	23
		Control	NA	NA	NA	40	22
		% Recuperación	NA	NA	NA	103%	105%
	Segundo lote	Prueba	NA	NA	NA	45	26
		Control	NA	NA	NA	42	24
		% Recuperación	NA	NA	NA	107%	108%
	Tercer lote	Prueba	NA	NA	NA	31	21
		Control	NA	NA	NA	33	20
		% Recuperación	NA	NA	NA	94%	105%
Caldo Neutralizante	Primer lote	Prueba					
		Control					
	Segundo lote	Prueba					
		Control					
	Tercer lote	Prueba					
		Control					

En esta tabla se observa el resultado de la prueba de promoción de crecimiento frente a los tres lotes de prueba.

El procedimiento evidenció que no existe ningún inhibidor para la recuperación de microorganismos debido a los agentes neutralizantes que se encuentran en el medio del caldo neutralizante que son el polisorbato, el tioglicolato, el tiosulfato y la lecitina, la recuperación es muy parecida a la prueba control.

Además, cuando se pesó los 10 g en el caldo neutralizante no presento un falso positivo. Así, se pesó siete veces por cada lote, a fin de poder enfrentar las cepas de referencia, con el transcurso del tiempo se iban disolviendo; sin embargo, si queremos lograr una disolución más completa se deberá llevar a baño maría en un tiempo aproximado de cinco minutos.

Asimismo, se procedió a la inoculación de 1 mL en dos placas para TSA y DSA de la cual obtuvimos después de tres días que, para las bacterias (TSA), las cantidades parecidas a la inoculación en la estandarización de cepas eran casi iguales como se muestra en la Tabla 4. De igual forma se realizó para el caso de hongos y levaduras (DSA) después de cinco días donde se obtuvo las cantidades parecidas a la estandarización de cepas.

El control negativo de todos los medios hubo ausencia de crecimiento por el cual la prueba de promoción de crecimiento cumple los requisitos establecidos por las normas oficiales en este caso la USP 42. En cambio, los medios de cultivo, sobre todo, agares como el caso del agar tripticasa de caseína y soja y agar dextrosa sabouraud deben tener una temperatura que no exceda los 45°C para poder plaquear las placas con muestra + diluyente + cepas y así no disminuir la recuperación bacteriana.

También se identificó cada cepa de referencia después de su crecimiento para no obtener falsos positivos esto debido al crecimiento amorfo, contaminación cruzada o ambiental. Así, al terminar la inoculación se trabajó el segundo lote de la misma manera y, por consiguiente, el tercer lote resultando el porcentaje de recuperación parecida al promedio establecido como se visualiza en la Tabla 5.

Finalmente, se realizó la comparación con los medios de cultivo, es decir,

después de que estos hayan cumplido su promoción de crecimiento; a fin de tener una mejor trazabilidad en el ensayo y que la recuperación no difiera, debido a la mala preparación, mal pesado, falla de la autoclave o por errores de infraestructura, siendo el peor de los casos falla del analista. Así, en la Tabla 6 se observan las comparaciones que se realizaron en el proceso de investigación, pues se va disminuyendo la carga microbiana o aumenta.

Tabla 9. Resultado de microorganismos específicos utilizados en la Validación de aptitud del método de recuento para Sulfametoxazol + Trimetoprima Tableta Recubierta - Especificidad.

Lote	Cepa	Medio de cultivo	Propiedad	Cepa de Referencia	Resultado
Primer lote	Escherichia coli ATCC 8739	Caldo MacConkey	Promocion de crecimiento inhibitoria	Escherichia coli	Presencia
		Agar MacConkey	Promocion de crecimiento	Staphylococcus aureus	Ausencia
	Salmonella Typhimurium ATCC 14028	Caldo Rappaport-vassiliadis	Promocion de crecimiento inhibitoria	Escherichia coli	Presencia
		Agar xilosa lisina desoxicolato	Promocion de crecimiento	Salmonella Typhimurium	Ausencia
	Pseudomonas aeruginosa ATCC	Agar Cetrimida	Promocion de crecimiento inhibitoria	Salmonella Typhimurium	Presencia
	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Agar manitol salado	Promocion de crecimiento inhibitoria	Pseudomonas aeruginosa	Escherichia coli
Segundo lote	Escherichia coli ATCC 8739	Caldo MacConkey	Promocion de crecimiento inhibitoria	Staphylococcus aureus	Presencia
		Agar MacConkey	Promocion de crecimiento	Escherichia coli	Ausencia
	Salmonella Typhimurium ATCC 14028	Caldo Rappaport-vassiliadis	Promocion de crecimiento inhibitoria	Salmonella Typhimurium	Presencia
		Agar xilosa lisina desoxicolato	Promocion de crecimiento	Staphylococcus aureus	Ausencia
	Pseudomonas aeruginosa ATCC	Agar Cetrimida	Promocion de crecimiento inhibitoria	Salmonella Typhimurium	Presencia
	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Agar manitol salado	Promocion de crecimiento inhibitoria	Pseudomonas aeruginosa	Escherichia coli
Tercer lote	Escherichia coli ATCC 8739	Caldo MacConkey	Promocion de crecimiento inhibitoria	Staphylococcus aureus	Presencia
		Agar MacConkey	Promocion de crecimiento	Escherichia coli	Ausencia
	Salmonella Typhimurium ATCC 14028	Caldo Rappaport-vassiliadis	Promocion de crecimiento inhibitoria	Salmonella Typhimurium	Presencia
		Agar xilosa lisina desoxicolato	Promocion de crecimiento	Staphylococcus aureus	Ausencia
	Pseudomonas aeruginosa ATCC	Agar Cetrimida	Promocion de crecimiento inhibitoria	Salmonella Typhimurium	Presencia
	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Agar manitol salado	Promocion de crecimiento inhibitoria	Pseudomonas aeruginosa	Escherichia coli

Tabla 10. Medición de pH de la preparación de la muestra con el diluyente utilizado sados en la Validación de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol+Trimetorpima en Tableta Recubierta.

Lote	Medio de cultivo	pH	Tiempo de Esterilizacion	pH antes de la esterilizacion	pH despues de la esterilizacion
Primer lote	Caldo Neutralizante	7.6±0.2	121° x 15 minutos	7.21	7.3
	Agar Tripticasa de caseina y soja	7.3±0.2	121° x 15 minutos	6.91	6.94
	Agar dextrosa sabouraud	5.6±0.2	121° x 15 minutos	5.1	5.14
	Agar MacConkey	7.1±0.2	121° x 15 minutos	7.2	7.23
	Agar Manitol Salado	7.4±0.2	121° x 15 minutos	7.41	7.43
	Agar Cetrimida	7.2±0.2	121° x 15 minutos	7.18	7.21
	Caldo Rappaport-vassiliadis	5.1±0.2	115°x15 minutos	5.11	5.13
	Caldo MacConkey	7.3±0.2	121° x 15 minutos	7.28	7.31
Segundo lote	Caldo Neutralizante	7.6±0.2	121° x 15 minutos	7.21	7.3
	Agar Tripticasa de caseina y soja	7.3±0.2	121° x 15 minutos	6.91	6.94
	Agar dextrosa sabouraud	5.6±0.2	121° x 15 minutos	5.1	5.14
	Agar MacConkey	7.1±0.2	121° x 15 minutos	7.2	7.23
	Agar Manitol Salado	7.4±0.2	121° x 15 minutos	7.41	7.43
	Agar Cetrimida	7.2±0.2	121° x 15 minutos	7.18	7.21
	Caldo Rappaport-vassiliadis	5.1±0.2	115°x15 minutos	5.11	5.13
	Caldo MacConkey	7.3±0.2	121° x 15 minutos	7.28	7.31
Tercer lote	Caldo Neutralizante	7.6±0.2	121° x 15 minutos	7.21	7.3
	Agar Tripticasa de caseina y soja	7.3±0.2	121° x 15 minutos	6.91	6.94
	Agar dextrosa sabouraud	5.6±0.2	121° x 15 minutos	5.1	5.14
	Agar MacConkey	7.1±0.2	121° x 15 minutos	7.2	7.23
	Agar Manitol Salado	7.4±0.2	121° x 15 minutos	7.41	7.43
	Agar Cetrimida	7.2±0.2	121° x 15 minutos	7.18	7.21
	Caldo Rappaport-vassiliadis	5.1±0.2	115°x15 minutos	5.11	5.13
	Caldo MacConkey	7.3±0.2	121° x 15 minutos	7.28	7.31

Parámetros de validación utilizados en la validación de la prueba de aptitud y microorganismo específicos de productos no estériles

Los parámetros de la exactitud y precisión son corroborados en la prueba de promoción de crecimiento que se realizó por triplicado. Cabe resaltar que los porcentajes para la recuperación microbiana son muy estrechos, es decir, los resultados no son exactos y precisos; de igual manera, se puede incorporar la técnica de estandarización de cepas donde se observó la recuperación específica por cada producto. Además, la robustez se realizó a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

Validación de aptitud del método de recuento y microorganismos específicos para productos no estériles

Durante este proceso se usó de igual manera medios de cultivo, en este caso caldo neutralizante ya inoculado con la cepa de referencia. Así se elaboró dos diluciones consecutivas y, por ende, se realizó la filtración. No se consiguió una buena filtración debido a la cantidad excesiva de sobrenadante y las partículas que quedaban en la membrana de filtración se incorporaron al medio específico agar tripticasa de caseína y soja para bacterias con una temperatura de 30 a 35°C y 20 a 25°C para hongos y levaduras. Por ello, después de la incubación se procedió a la contabilización de bacterias y hongos donde no se observó ningún crecimiento, solo se evidenció una capa de sobrenadante que invalida la prueba.

En conclusión, las pruebas de promoción de crecimiento y estandarización de cepa dan conforme, debido a que se trazó también por el método de inoculación directa.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Discusión

Respecto al objetivo general, es decir, validar el examen microbiológico de Sulfametoxazol + Trimetoprima tableta recubierta, mediante la aptitud del método de recuento e identificación de microorganismos específicos, se corroboró la calidad del producto, debido a que los principios activos y excipientes no interfirieron en la recuperación de los microorganismos empleados en el desarrollo de la validación, ya que se utilizaron los agentes neutralizantes que nos brinda la USP 42, usando el caldo neutralizante para su inhibición de las mismas, también nos enfocamos en el método de inoculación directa debido a una completa disolución de las tabletas recubiertas, la recuperación de los microorganismos de referencias fueron precisos y exactos.

En comparación con el estudio realizado Parra L. en el año 2016 titulada “Validación de metodología en análisis microbiológico de dos formas farmacéuticas sólidas” se evidenció la validación del método por inoculación directa donde se obtuvieron una mejor identificación y recuperación de los distintos microorganismos de prueba en la cual no hubo la necesidad del uso de agentes neutralizantes.

Finalmente, respecto a los objetivos específicos la validación de los distintos ensayos microbiológicos asegura la calidad de los productos farmacéuticos y están siendo evaluadas de manera permanente. En este trabajo de tesis se han evaluado dos métodos para los productos no estériles en cuya fabricación se ven involucradas áreas y máquinas no clasificadas como estériles, pero cumpliendo con sus especificaciones. Por otro lado el uso de cepas certificadas ATCC, nos brindan confiabilidad a los ensayos realizados debido a las características específicas de cada cepa, las cuales constan de bacterias patógenas y microorganismos ambientales que pueden afectar la integridad del producto, además, los resultados obtenidos demuestran que los productos evaluados son susceptibles a la contaminación de las cepas

utilizadas, lo que refuerza la idea de que un ensayo de validación permite elucidar que los componentes de un producto farmacéutico pueden inhibir o favorecer el crecimiento bacteriano que en comparación de Alejandro G. en el año 2018 realizó en Ecuador la tesis titulada “Control Microbiológico de Jarabes de Origen Natural para Trastornos Gastrointestinales, de la ciudad de Quito identifico y utilizo cepas no ATCC las cuales en su metodología utilizo cepas de referencia en las cuales se tiende a asegurar la calidad y morfología de cada cepa. Para los métodos de estandarización de cepa la (USP 42 -2019) nos brinda especificaciones técnicas como por ejemplo obtener un recuento de ≤ 100 UFC, pero la parte analítica lo realiza cada analista como realizar las diluciones y sobre todo estandarizar el método. La promoción de crecimiento es una técnica cuali-cuantitativo en la que podemos identificar de manera general los distintos microorganismos esta técnica viene de la mano junto con la prueba de estandarización y se tiene que validar con los distintos parámetros que nos brindan las normas en el caso de Vivas J. en el año 2015 se realizó la tesis titulada “Validación del Método de Recuento Microbiano y de Determinación de Microorganismos Específicos en productos Farmacéutico No Estériles” se evidencio la validación del método de inoculación directa en la dilución 1/10 con el diluyente caldo letheen dando como el resultado de la conformidad ≤ 10 UFC/mL y para microorganismos específicos de prueba presento un recuento promedio más cercano a 100 UFC. No obstante, en los resultados de este trabajo se puede observar una recuperación microbiana comparable entre en el grupo de prueba y el grupo control con respecto a la prueba de recuento microbiano, por lo tanto, se deduce que la muestra no inhibe el crecimiento microbiano ya que se utilizó distintos neutralizantes para su análisis respectivo a comparación de la tesis de Morales M. en el año 2018 “Validación del Examen Microbiológico de Bicarbonato de sodio y Sulfazadiazina de plata según USP Vigente “donde del mismo modo donde recupere las mismas cantidad de ufc que nos brindas las normas pero en este caso no se utilizó neutralizantes debido que el producto a evaluar no presento inhibición en los microorganismo de prueba.

En el caso de los parámetros de validación que nos brinda las normas oficiales (USP 42) solo nos indican de manera referencial como son la exactitud, precisión y especificada para este trabajo el parámetro de especificidad se demostró con la identificación cualitativa de los medios de cultivo, en el caso de precisión se identificó con una dilución de 10^{-6} (obtenidos en la estandarización de cepas), para todos los microorganismos de prueba y para exactitud el promedio obtenido en los distintos medios de cultivos a evaluar.

Sin embargo, a pesar de estas observaciones, se puede asegurar que los métodos utilizados para la validación cumplen con los estándares nacionales para el desarrollo de técnicas analíticas que permitan elucidar que los productos evaluados son propensos a contaminarse con microorganismos patógenos y ambientales y que pueden ser evaluados mediante métodos estandarizados.

4.2. Conclusiones

- Se evaluó la estandarización de cepas de referencia requeridas para el método de recuento y de identificación de microorganismos específicos en una dilución de 10^{-6} recuperando de 10 a 100 UFC según en la especificación de la USP 42.
- Los medios evaluados Caldo Neutralizante, Agar Tripticasa de Soya, Agar Sabouraud, Caldo Mac Conkey, Caldo Rappaport Vassiliadis, Agar Mac Conkey, Agar Manitol Salado, Agar Cetrimide, son aptos para la promoción de crecimiento de los microorganismos de prueba según la especificación de la USP 42.
- Se comprobó el parámetro de precisión en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos con un porcentaje de 50 a 200 % UFC según especificación de la USP 42.
- Los métodos realizados quedan validados para la aptitud del método

de recuento e identificación de microorganismos específicos para el producto farmacéutico Sulfametoxazol + Trimetoprima en Tableta Recubierta.

- Se corrobora en el parámetro de exactitud para los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42.
- Se evaluó el cumplimiento del parámetro de especificidad en el método de microorganismos específicos según USP 42.
- Se determinó en los tres lotes de producto los parámetros de precisión y exactitud que aplican a los métodos de recuento e identificación de microorganismos según especificación USP 42.

4.3. Recomendaciones

- Realizar una técnica reproducible utilizando las distintas especificaciones brindadas por la USP 42 para la prueba de estandarización de cepas.
- Utilizar neutralizantes específicos para la neutralización del principio activo siempre y cuando se conozca el origen y la acción farmacológica del mismo.
- Tener conocimiento del tipo de excipiente utilizado en la fabricación de las distintas formas farmacéuticas.
- Se recomienda realizar la prueba de aptitud del método de recuento para aquellos productos que se encuentran en etapa de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. El peruano. Normas legales: Ley N° 29459 “Ley de los productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios. 1 – 12; 2009.
2. Ministerio de Salud. Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios. Decreto Supremo 016-2011-SA. Lima: MINSA; 2018.
3. Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42). Capítulo: Validación de Procedimientos Farmacopeicos <1225>; 2019.
4. El Peruano. Decreto Supremo que aprueba el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Calidad de Productos Farmacéuticos; 2018.
5. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001
6. Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42). Capítulo: Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano <61>; 2019.
7. Farmacopea de los Estados Unidos (USP 42). Capítulo: Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Microorganismos Específicos <62>; 2019.
8. United States Pharmacopeia. Chapter: Validation of Compensatory Procedures: Analytical Performance Characteristics, Ed. 39, 1 – 6; 2019.

9. Organismo Argentino de Acreditación. Guía para la validación de métodos de ensayo; 2013
10. Food and Drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry. New Hampshire: FDA; 2015
11. Ministerio de Salud. Documento técnico: Manual de buenas prácticas de laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos. Resolución Ministerial 485-2013/MINSA. Lima: MINSA;2018
12. Flórez J. Farmacología Humana. Sexta ed.: Elsevier. España; 2013.
13. United States Pharmacopeia. Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial enumeration tests. Sixth Interim Revision Announcement; 2016.
14. Sanz S. Prácticas de microbiología. Segunda ed. Logroño: Universidad de La Rioja. España:2011.
15. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbiology Review. 2003; 27(2-3): p. 341-353.
16. Reyes F, Palou E, López A. Métodos de evaluación de la actividad. Temas selectos de ingeniería de alimentos. 2014; 8(1): p. 68-78.
17. Perilla LM. Verificación de la aptitud de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos para productos terminados, elaborados en Anglopharma S.A. Tesis de licenciatura en

Microbiología Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana;2013.

18. Medio de cultivo. [Online]; 2017. Acceso Disponible en: [https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_\(Microbiolog%C3%ADa\)](https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_(Microbiolog%C3%ADa))
19. American Type Culture Collection (ATCC). Pharmaceutical Microbiology; Estados Unidos.2017
20. Food and Agriculture Organization (FAO). Manual de Aseguramiento de Calidad del Laboratorio Perfecton: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Venezuela. 2004.
21. Westgard J. Sistemas de Gestión de la Calidad para el Laboratorio Clínico: Wallace Coulter; Cuba.2014.
22. Alejandro G. Control microbiológico de jarabes de origen natural para trastornos gastrointestinales, de la ciudad de Quito. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2018.
23. Vivas J. Validación del Método de Recuento Microbiano y de Determinación de Microorganismos Específicos en productos No Estériles. Tesis de licenciatura Biología. Venezuela. Universidad Simón Bolívar. Marzo; 2015.
24. Morales M. Validación del Examen Microbiológico del Bicarbonato de Sodio y Sulfadiazina de plata según USP vigente. Tesis de licenciatura en Biología. Lima: Universidad Ricardo Palma; 2018.
25. Martínez JV. Control microbiológico de productos naturales de uso tópico con fines cicatrizantes, comercializados en centros naturistas y mercados de la ciudad de Quito. Tesis de Químico Farmacéutico. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2018.

26. Sueros G. Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial. Tesis de licenciatura Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
27. Parra LC. Validación de metodología análisis microbiológico de dos formas farmacéuticas sólidas. Tesis de licenciatura. Valparaiso: Universidad de Chile; 2016.
28. Ministerio del Ambiente. [Online].; 2019.. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/06/ley-general-del-ambiente.pdf>.
29. Organización Panamericana de Salud. Manual para la manipulación de alimentos. [Online].; 2017. Acceso 25 de mayo de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i7321s.pdf>.
30. Vu N, Lou J, Kuepic T. Microbial limit test for nonsterile pharmaceuticals, part 2. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 2014; 18(3): p. 1-9. 31.

United States Pharmacopeia 42, (2019). Chapter: Antimicrobial
31. Effectiveness Tests, Ed. 42, 6456 – 6458.

United States Pharmacopeia 42, (2019). Chapter: Validation of
32. Microbiological Methods Alternatives, Ed. 42, 8370 – 8372.

ANEXOS

Anexo A. Matriz de consistencia

Problema General	Objetivo General	Hipótesis General	Variable	Metodología
¿Cómo asegurar la validación del examen microbiológico de Sulfametoxazol + Trimetoprima tabletas recubiertas, mediante la aptitud del método de Recuento e identificación de microorganismos específicos, según la USP 42?	Validar el examen microbiológico de Sulfametoxazol + Trimetoprima tabletas recubiertas, mediante la aptitud del método de recuento e identificación de microorganismos específicos con arreglo a la USP 42.	La validación del examen microbiológico de Sulfametoxazol + Trimetoprima tabletas recubiertas, mediante la aptitud del método de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple la USP 42.		
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas		
¿Cómo estandarizar las cepas de referencia requeridas para el método de recuento y el método de Identificación de microorganismos específicos con arreglo a la USP 42?	Evaluar la estandarización de las cepas de referencia requeridas para el método de recuento y de identificación de microorganismos específicos, a la concentración especificada por la USP 42	La estandarización de las cepas de referencia requeridas para el método de recuento e identificación de microorganismos específicos, a la concentración especificada cumple con la USP 42	Validación del método de recuento e identificación de microorganismos específicos.	Recuento directo y filtración por membrana
¿Cómo asegurar la promoción de crecimiento para los medios involucrados en los métodos de recuento y de identificación de microorganismos específicos con arreglo a la USP 42	Evaluar el cumplimiento la promoción de crecimiento para los medios involucrados en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42	La promoción de crecimiento para los medios involucrados en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple con la USP 42		

¿Cómo probar que los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumplen con el parámetro de precisión con arreglo a la USP 42?	Evaluar el cumplimiento del parámetro de precisión en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42	El parámetro de precisión en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42		
¿Cómo probar que los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos son aptos con arreglo a la USP 42?	Evaluar la aptitud de los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42	La aptitud de los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple con la USP 42?		
¿Cómo probar que los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumplen con el parámetro de exactitud con arreglo a la USP 42?	Evaluar el cumplimiento del parámetro de exactitud en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42	El parámetro de exactitud en los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumple con la USP 42		
¿Cómo probar que los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos cumplen con el parámetro de especificidad con arreglo a la USP 42?	Evaluar el cumplimiento del parámetro de especificidad en el método de microorganismos específicos según la USP 42	El parámetro de especificidad en el método de microorganismos específicos cumple con la USP 42		
¿Cómo probar estadísticamente que los parámetros de precisión y exactitud que aplican a los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos son confiables con arreglo a la USP 42?	Evaluar en tres lotes de producto los parámetros de precisión y exactitud que aplican a los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42	La réplica en tres lotes de producto cumple con los parámetros de precisión y exactitud que aplican a los métodos de recuento e identificación de microorganismos específicos según la USP 42		

Anexo B. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Dimensión	Indicador	Valores	Criterios de medición	Escala de medición de variable	Instrumentos de recolección de datos
Validación del método de recuento e identificación de microorganismos específicos.	Procedimiento analítico que establece las características de desempeño que asegura el cumplimiento de los requisitos de reproducibilidad, confiabilidad, exactitud y precisión.	Parámetros de validación	Precisión: Estandarización del Inóculo	Concentraciones: 10^{-4} 10^{-6}	Recuperación microbiana	Logaritmo	Formato acorde: USP 42
			Exactitud	Inóculo estandarizado: ≤ 100 UFC	Recuperación microbiana	Inóculo estandarizado (Factor 2)	Formato acorde: USP 42
			Especificidad	1 asada	Identificación microbiana	Ausencia o presencia	Formato acorde: USP 42

Anexo C. Procedimientos en las pruebas

PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS PARA SULFAMETOXAZOL+TRIMETOPRIMA POR EL MÉTODO VERTIDO EN PLACA

La prueba de recuento microbiano por el método de vertido en placa se realizó bajo las normas oficiales de la farmacopea americana (USP).

Preparación de la Solución Muestra

Se preparó 7 soluciones muestras de la siguiente manera:

Se pesó 10 g de la muestra en un frasco de 250 mL con 90 mL caldo neutralizante, luego de cada frasco se transfirió un inóculo de 10-100 UFC de las cepas *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Se transfirió 1 mL de cada frasco a dos placas estériles en donde se agregó aproximadamente 20 mL de agar dextrosa sabouraud para cada microorganismo específico: *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, luego se hizo una ligera homogenización a las placas, una vez sedimentado el agar, se incubaron por 5 días a una temperatura de 20 a 25°C y concluido la incubación se contabilizo las colonias obtenidas, este proceso se realizó por triplicado.

En el caso de las bacterias se agregó aproximadamente 20 mL de agar tripticasa de caseína y soja para las cepas *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, luego se hizo una ligera homogenización a las placas, una vez sedimentado el agar, se incubaron por 3 días a 30-35°C al final de este proceso se contabilizo las colonias obtenidas, este proceso se realizó por triplicado.

Pseudomonas aeruginosa: se pesó 1 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de caldo neutralizante estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. Con un asa de Khole, se sembró del Caldo

neutralizante a una placa con Agar Cetrimide, y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Luego de obtener colonias típicas, se sembró una de las colonias resultante en una placa con Agar Pseudomonas P y Agar Pseudomonas F y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas, pero generalmente este proceso de aislamiento tiene como máximo una incubación por 7 días.

Por otro lado, se realizó la prueba de tinción de Gram para poder identificar su morfología y tener pruebas más confirmatorias.

Staphylococcus aureus: Se pesó 1 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de caldo neutralizante estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. Con un asa de khole, se sembró, del Caldo neutralizante, en una placa con Agar Manitol Salado, y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Luego de obtener colonias típicas.

También se le realizó la prueba de tinción de Gram para así poder identificar la morfología y tener pruebas más confirmatorias.

Escherichia coli: Se pesó 1 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de caldo neutralizante estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. Posteriormente, se transfirió 1 mL del caldo neutralizante y se inoculó en 100 mL de Caldo Mac Conkey, el cual se incubó a 42 – 44°C por 24 horas. Después de su incubación con un asa de siembra, se sembró a una placa con Agar Mac Conkey, y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Luego de obtener un crecimiento típico de *Escherichia coli*, se confirmó sembrando la cepa en una placa con Agar Eosina metil bromuro, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. También se le realizó la prueba de tinción de Gram para así poder identificar la morfología y tener pruebas más confirmatorias.

Salmonella typhimurium: Se pesó 10 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de caldo neutralizante estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. Se transfirió 100 µL del frasco anterior a un tubo con 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis, el cual se incubó a 30- 35°C por 24 horas. Finalmente, con un asa de siembra, se sembró del Caldo Rappaport-Vassiliadis a una placa con Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato para la

obtención de colonias típicas, se confirmó la presencia de la cepa.

También se le realizó la prueba de tinción de gran para así poder identificar la morfología y tener pruebas confirmatorias. Además, para el caso de los hongos se le realizó la prueba de promoción de crecimiento.

PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y MICROORGANISMO ESPECÍFICOS PARA SUFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIMA POR EL MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Para la prueba de recuento microbiano para sulfametoxazol + trimetoprima se realizará por el método de filtración por membrana de acuerdo a las normas USP 42.

Preparación de la Solución Muestra

Se preparó 7 soluciones muestras de la siguiente manera:

Se pesó 10 g del producto en un frasco de 250 mL con 90 mL buffer fosfato diluido pH 7,0 (B7) a continuación, bajo mechero, se procedió a filtrar 10 mL de la solución en un equipo de filtración estéril. El filtrado se enjuagó, en tres repeticiones, con 100 mL de solución B7 estéril.

En el último enjuague se inoculó aproximadamente de 10 – 100 UFC de las cepas *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Por último, la membrana de filtración se colocó a una placa de agar tripticasa de caseína y soja, para el recuento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, la cual se incubó a 30-35°C de 3 a 5 días para el caso de hongos y levaduras en una placa de agar dextrosa sabouraud, para el recuento de las cepas *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, la cual se incubó a 20-25°C por 5 días.

Al final de cada periodo de incubación se contaron las colonias obtenidas para cada cepa. Este procedimiento se realizó por triplicado. Para la prueba de

microorganismo específico, se realizó con la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739, de acuerdo a las normas USP 42. En este caso, se pesó 1 g del producto y se disolvió en un frasco de 200 mL con 90 mL de buffer fosfato diluido pH 7,0 (B7). Luego se procedió a filtrar todo el contenido del frasco de forma aséptica. El filtrado se enjuagó en tres repeticiones, con 100 mL de B7 estéril. En el último enjuague se inocularon aproximadamente de 10 – 100 ufc de la cepa mencionada anteriormente.

Finalmente, se retiró la membrana de filtración cuidadosamente, y se colocó en un frasco con 90 mL de Caldo Neutralizante (CN) estéril, el cual se incubó a 30-35°C por 24 – 28 horas. Posteriormente, se transfirió 1 mL del caldo neutralizante a un frasco de 100 mL de Caldo Mac Conkey (CMC), el cual se incubó a 42 – 44°C por 24 horas. A continuación, con un asa de siembra, se sembró a una placa con Agar Mac Conkey, y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Al observarse un crecimiento típico de *Escherichia coli*, se confirmó sembrando la cepa en una placa con Agar eosina metilbromuro, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 horas.

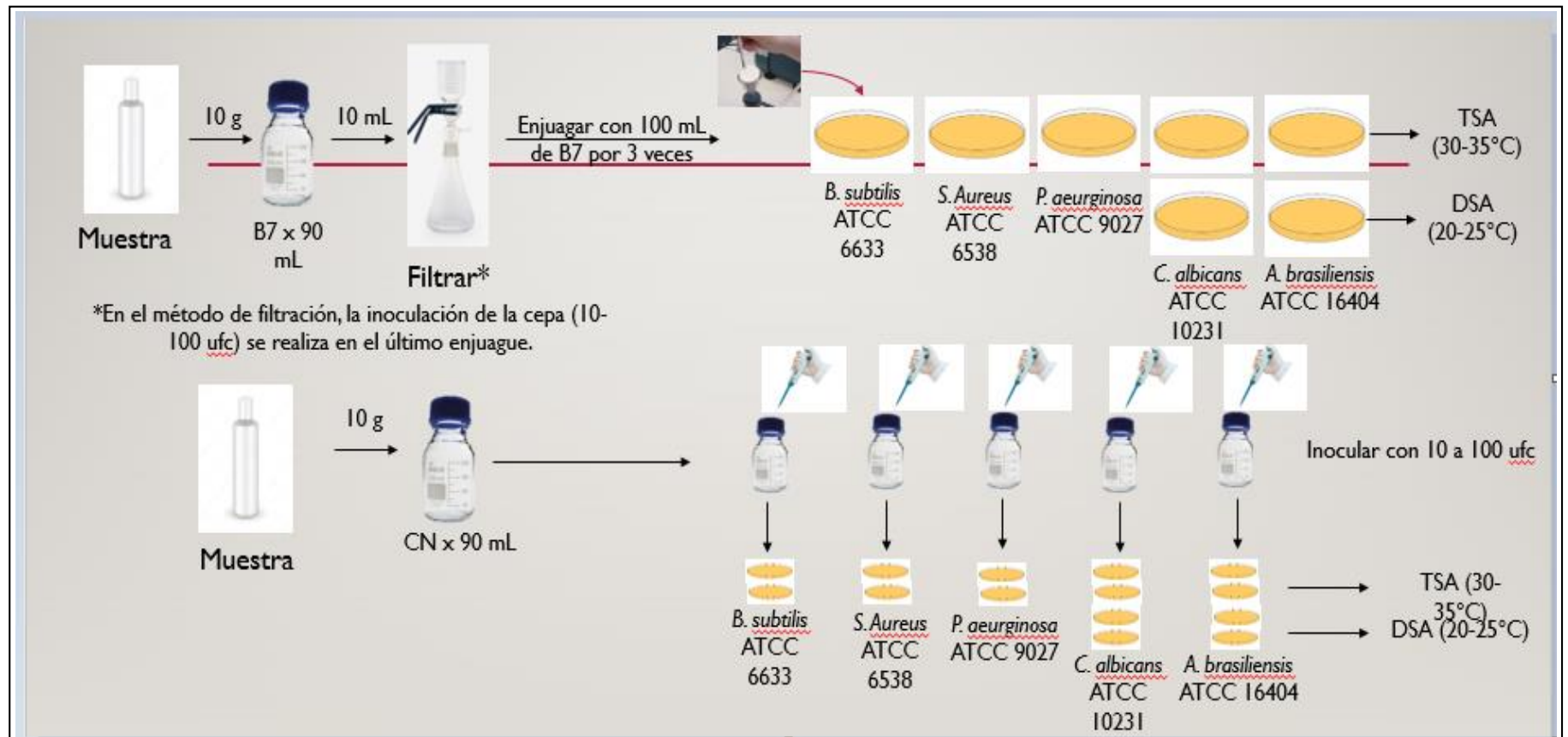


Figura 5. Aptitud de examen microbiológico de productos no estériles.

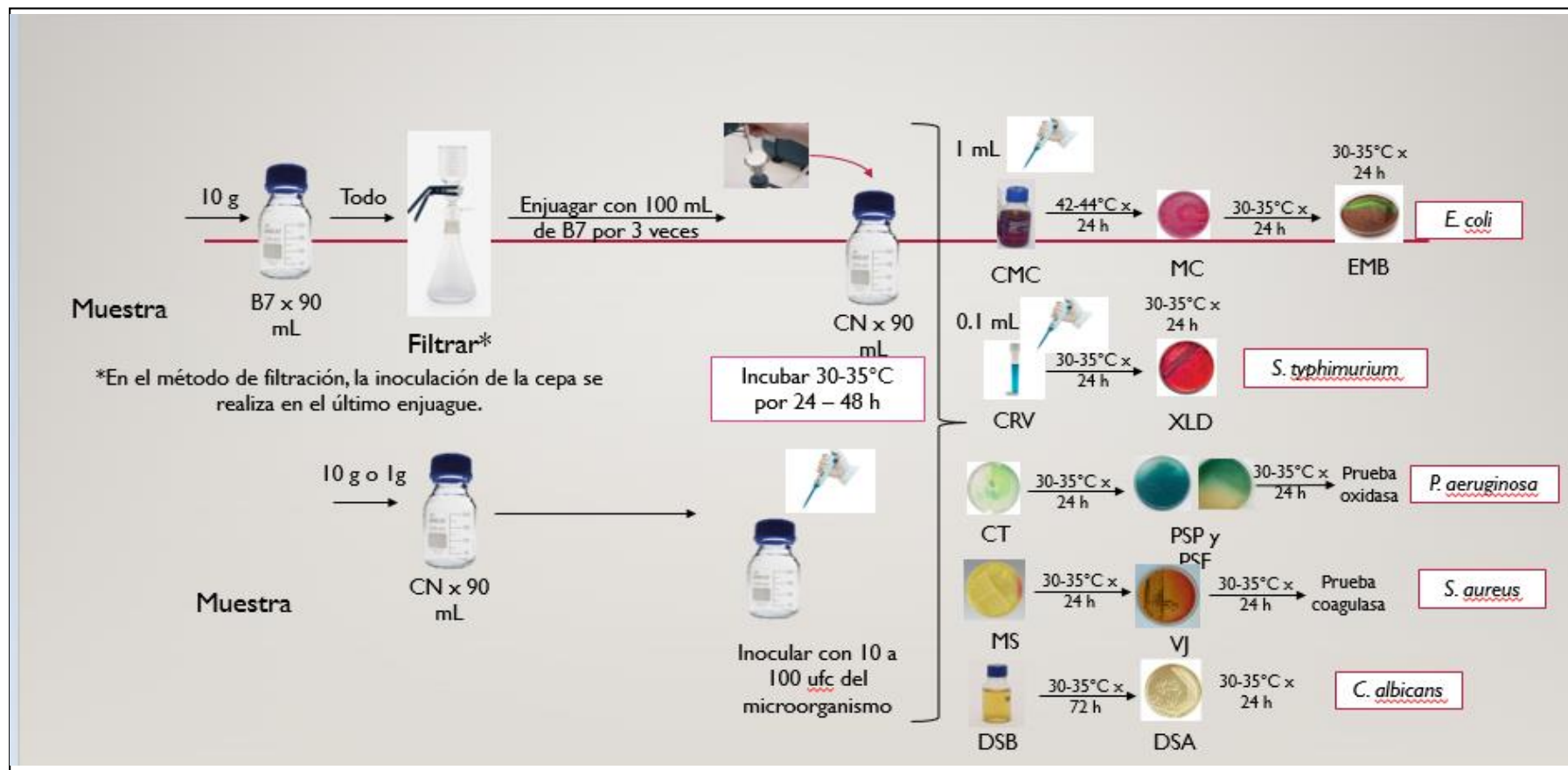



Figura 6. Prueba para microorganismos específicos.

Anexo D. Formatos de validación

a) Formatos validados por expertos



Universidad
Norbert Wiener

B. FORMATO DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO


I. DATOS GENERALES

1. Apellidos y Nombres del experto: *Muñoz Arellano Kenny*
2. Cargo e institución donde labora: *Analista de Control de Calidad*
3. Nombre del instrumento motivo de evaluación: *Formulario*
4. Autor (a) del instrumento: *Bach. Elizabeth Haricoramen Yurkwaldo Suarez*

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

N°	Item	Relevancia			Pertinencia			Claridad			Sugerencias	
		MD	D	A	MD	D	A	MD	D	A		MA
Dimensión 1:												
1	<i>Registro de Materiales y</i>											
2	<i>Ver de los tipos de Prueba</i>			3								
3												
4												
5												
6												
Dimensión 2:												
7	<i>Exposición de Aptitud del</i>											
8	<i>Métodos de Recuento</i>			3								
9												
10												
11												
12												
Dimensión 3:												
13	<i>Prueba de Pasividad de</i>											
14	<i>Se observan control</i>											
15	<i>reactivos y el transcurso</i>			3								
16	<i>de tipo</i>											
17												

III. DOCUMENTOS ADJUNTOS: Matriz de consistencia, Operación de variables



Kenny Muñoz Arellano
 QUÍMICO FARMACÉUTICO

 Firma y sello del experto

Página 7/8

Calificación:

MD	D	A	MA
1	2	3	4

Dónde: MD: Muy en desacuerdo
D: En desacuerdo
A: De acuerdo
MA: Muy de acuerdo

Pertinencia: El ítem corresponde al concepto técnico formulado

Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

Claridad: Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

B. FORMATO DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

1. Apellidos y Nombres del experto: *Robledo Ospina*
2. Cargo e institución donde labora: *Safe de Control de Calidad*
3. Nombre del instrumento motivo de evaluación: *Foi matado*
4. Autor (s) del instrumento: *Bach: María Estrella Simón de la Cruz,
Bach: Elizabeth Narisayman Yshuacillo Saenz*

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

N°	Ítem	Relevancia			Pertinencia			Claridad			Sugerencias	
		MD	D	A	MA	D	A	MA	D	A		MA
Dimensión 1:												
1	Requisito de Mantenimiento y			3			4					
2	Usos de los Sepe de Pasarela											
3												
4												
5												
6												
Dimensión 2:												
7	Ejemplos de Calidad			3			4					
8	del Material de Recuento											
9												
10												
11												
12												
Dimensión 3:												
13	Prueba de Promoción de			3			4					
14	Recuento y Sentido											
15	de Negativa y Estabilización											
16	de Tipos											
17												

Calificación:

MD	D	A	MA
1	2	3	4

Dónde: MD: Muy en desacuerdo
D: En desacuerdo
A: De acuerdo
MA: Muy de acuerdo

Pertinencia: El ítem corresponde al concepto teórico formulado

Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

Claridad: Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

ENCUENTROS PRESENTACIONAL DE S.A.C

O.F. ROMMEL ROBLADILLO OSPINA
Jefe de Control de Calidad
C.O. E.P. N° 1002

Firma y sello del experto

III. DOCUMENTOS ADJUNTOS: Matriz de consistencia, Operación de variables

B. FORMATO DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

1. Apellidos y Nombres del experto: *Santa Cruz Durand Lisbet*
2. Cargo e institución donde labora: *JEFE DE ASSESORAMIENTO DE LA CALIDAD*
3. Nombre del instrumento motivo de evaluación: *Formato*
4. Autor (s) del instrumento: *Bach: Marco Ernesto Simbrón de la Cruz*
Bach: Elizabeth Maricarmen Yumbales Sotelo

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

N°	Ítem	Relevancia			Pertinencia			Claridad			Sugerencias
		MD	D	A	MD	D	A	MD	D	A	
1	Dimensión 1: <i>Uso de Trabajo de la parte de</i> <i>Instrumento</i>										
2				3			3				
3											
4											
5											
6											
7	Dimensión 2: <i>Expansión de</i> <i>Aptitud del Método</i> <i>de la</i>										
8											
9				3			3				
10											
11											
12											
13	Dimensión 3: <i>Uso de Trabajo de</i> <i>Uso de Aptitud de</i> <i>Responsables</i>										
14											
15				3			3				
16											
17											

Calificación:

MD	D	A	MA
1	2	3	4

Dónde: MD: Muy en desacuerdo
D: En desacuerdo
A: De acuerdo
MA: Muy de acuerdo

Pertinencia: El ítem corresponde al concepto teórico formulado

Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

Claridad: Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

III. DOCUMENTOS ADJUNTOS: Matriz de consistencia, Operacionalización de variables

Lisbet
D.E. LISBET SANTA CRUZ DURAND
Jefe de Asesoramiento de la Calidad
Firma y sello del experto

ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS DE PRUEBA

CEPAS DE PRUEBA	LOTE DE CEPA	ESTANDARIZACIÓN		LECTURA DE ESTANDARIZACIÓN		DILUYENTE (*)	NIVEL DE DILUCIÓN	RECuentos en placa				CONCENTRACION DE CEPA	DILUCION A UTILIZAR (10 - 100 UFC/mL)
		FECHA	REALIZADO POR	FECHA	REALIZADO POR			1º PLACA	2º PLACA	3º PLACA	PROMEDIO		
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404													
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633													
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231													
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739													
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027													
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028													
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538													



Universidad Norbert Wiener
Facultad Farmacia y Bioquímica

Yo, Arturo Federico Crosby Solari representante legal de Laboratorio y Drogueria Pharmed Corporation, autorizo la ejecución del proyecto de investigación: "Validación de Aptitud del Método de Recuento y Microorganismos Especificos para Sulfametoxazol+Trimetoprima Tableta Recubierta", en el cual se utilizará las instalaciones, equipos y materiales durante los procesos de las distintas etapas de investigación

Así mismo dicha investigación se ejecutará en el mes de agosto del presente año y culminará dependiendo de los resultados obtenidos.

Por lo tanto, me comprometo que cumplan con las buenas prácticas de laboratorio e investigación y con el cronograma de supervisión de la ejecución según corresponda.

Atentamente

Firma y Sello:

DNI:

ARTURO CROSBY SOLARI
GERENTE GENERAL
DNI 07812379
DROGUERIA E.S.C. PHARMED CORPORATION SAC
RUC: 20505578806