



Universidad Norbert Wiener

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

**“IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN
POR MEMBRANA EMPLEANDO EL SISTEMA DE
FILTRACIÓN EZ-FIT™ EN ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO DE AGUA PURIFICADA EN
LABORATORIO DE CAMELOS FARMACÉUTICOS
EN EL PERIODO DE MAYO – OCTUBRE DEL 2019”**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

Br.: Minaya Laureano Maribel Florencia

Asesor:

Q.F Guevara Vicaña, Rita Aurora.

Lima – Perú

2020

DEDICATORIA

A mis padres Flor y Gregorio; gracias por su amor y esfuerzo espero me alcance la vida para regalarles un pedacito de todo lo grandioso que recibo día tras día, gracias por enseñarme desde niña a luchar para alcanzar mis metas. Mi triunfo es de ustedes.

A mi esposo Felipe gracias por ser mi apoyo, no hay nadie en el mundo que pueda reemplazarte eres mi mejor complemento, gracias por tu apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Privada Norbert Wiener, a nuestra facultad de farmacia y bioquímica, a los docentes que nos han brindado sus enseñanzas y orientaciones, con lo cual han contribuido en nuestro desarrollo profesional.

A mi asesora de tesis Q.F Guevara Vicaña, Rita Aurora, por su apoyo, consejos y sugerencias para realizar este trabajo de investigación.

INDICE

	Pág.
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación problemática	3
1.2. Marco teórico referencial	4
1.3. Estudios antecedentes	9
1.4. Importancia y justificación de la investigación	13
1.5. Objetivo del estudio	14
1.5.1. Objetivo General	14
1.5.2. Objetivos Específicos	14
1.6. Hipótesis	15
1.6.1. Hipótesis verdadera o de trabajo	15
1.6.2. Hipótesis nula	15
II. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Enfoque y diseño	16
2.2. Muestra	16
2.2.1. Criterios de inclusión	16
2.2.2. Criterios de exclusión	16
2.3. Variable de estudio	16
2.3.1. Variable independiente	16
2.3.2. Variable dependiente	17
2.3.3. Metodología	17
2.3.3.1. Materiales	17
2.3.3.2. Reactivos	18
2.3.3.3. Equipos	18
2.3.4. Preparación del material pre-muestreo	18
2.3.4.1. Preparación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ..	19

2.3.4.2.	Preparación de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.3.4.3.	Preparación de <i>Escherichia coli</i>	22
2.3.5.	Siembra	23
2.3.6.	Incubación de muestras	28
2.3.7.	Recuento de colonias	29
2.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	30
2.4.1.	Técnica	30
2.4.2.	Instrumentos de recolección de datos	30
2.5.	Proceso de recolección de datos	31
2.5.1.	Autorización	31
2.5.2.	Aplicación	31
2.6.	Métodos de análisis estadístico	31
2.6.1.	Porcentaje de recuperación	31
2.6.2.	Prueba T de Student	32
III.	RESULTADOS	33
3.1.	Tablas	33
3.2.	Figuras	39
IV.	DISCUSIÓN	42
4.1.	Discusión	42
4.2.	Conclusiones	44
4.3.	Recomendaciones	45
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1:	Resultado del promedio y porcentaje de recuperación de <i>P. aeruginosa</i>	33
Tabla N° 2:	Resultado del promedio y porcentaje de recuperación de <i>S. aureus</i>	34
Tabla N° 3:	Resultado del promedio y porcentaje de recuperación de <i>E. coli</i>	35
Tabla N° 4:	Réplicas de repetibilidad del método de filtración para <i>P. aeruginosa</i>	36
Tabla N° 5:	Réplicas de repetibilidad del método de filtración para <i>S. aureus</i>	37
Tabla N° 6:	Réplicas de repetibilidad del método de filtración para <i>E. coli</i>	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1:	Flujo de preparación de concentraciones de microorganismos ATCC.....	23
Figura N° 2:	Diagrama de flujo de preparación de concentración, Incubación y lectura.....	30
Figura N° 3:	Gráfica de caja de <i>P. aeruginosa</i> en medio TSA y unidad de filtración.....	39
Figura N° 4:	Gráfica de caja de <i>S. aureus</i> en medio TSA y unidad de filtración.....	40
Figura N° 5:	Gráfica de caja de <i>S. aureus</i> en medio TSA y unidad de filtración.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A:	Matriz de consistencia.....	50
Anexo B:	Operacionalización de variables.....	51
Anexo C:	Certificado de <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027.....	52
Anexo D:	Certificado de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	54
Anexo E:	Certificado de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	56
Anexo F:	Certificado de medio líquido <i>Pseudomona aeruginosa</i>	58
Anexo G:	Certificado de medio líquido m-HPC/SPC.....	59
Anexo H:	Certificado de medio líquido m-ColiBlue24.....	60
Anexo I:	Certificado de medio agar TSA.....	62
Anexo J:	Certificado de calibración de incubadora.....	64
Anexo K:	Certificado de verificación de cabina de Bioseguridad.....	66
Anexo L:	Certificado de calibración de refrigeradora.....	69
Anexo M:	Certificado de calibración de autoclave.....	70
Anexo N:	Certificado de calibración de micropipeta.....	72
Anexo O:	Aprobación laboratorio V. Ravettino S.R.L.	73
Anexo P:	Fotos	74

RESUMEN

El presente trabajo de tesis, tiene por objetivo: Comparar la implementación del método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™ en Laboratorio de caramelos farmacéuticos en el análisis de agua purificada para uso farmacéutico.

El diseño de investigación es observacional, analítico y descriptivo y nos permitió comprobar que la especificación mínima del porcentaje de recuperación del microorganismo inoculado en cada una de las concentraciones fue mayor a 70%, usando el método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™, así mismo se evidencio que los datos presentaron una distribución normal, lo cual nos permitiría emplear para comparar los resultados de ambos métodos la prueba estadística de t-student, con un nivel de confianza de 95 % para los intervalos de sus resultados en el recuento microbiano usando medio agar TSA y en el recuento microbiano usando el método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™.

Este trabajo determino que las diferencias de medias de recuperación de ufc de los cultivos de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* no son estadísticamente significativas por lo que usar cualquiera de las dos técnicas mostraría resultados satisfactorios de comprobación de crecimiento microbianos en el agua purificada; no obstante, el laboratorio de acuerdo a sus procedimientos establecidos, es quien decide la aplicación o no de cualquiera de ellos, anteponiendo para ello los beneficios de la gestión.

Palabras clave: Filtración por membrana, Sistema de filtración, EZ-FIT™, Agua purificada.

ABSTRACT

The present thesis work aims to: Compare the implementation of the membrane filtration method using the EZ-FIT™ filtration system in a pharmaceutical candy laboratory in the analysis of purified water for pharmaceutical use, the aptitude of this new one compared to the traditional one.

The research design is observational, analytical and descriptive and allowed us to verify that the minimum specification of the recovery percentage of the inoculated microorganism in each one of the concentrations was greater than 70%, using the membrane filtration method using the EZ filtration system. - FIT™, likewise it was evidenced that the data presented a normal distribution, which would allow us to use the statistical t-student test to compare the results of both methods, with a confidence level of 95% for the intervals of its results in the microbial count using TSA agar medium and in the microbial count using the membrane filtration method using the EZ-FIT™ filtration system.

This work determined that the differences in the recovery means of cfu of the cultures of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* are not statistically significant, so using either of the two techniques would show satisfactory results of verifying microbial growth in purified water, despite the laboratory in accordance with its established procedures, is the one who decides whether or not to apply any of them, prioritizing benefits for management.

Keywords: Membrane filtration, filtration system, EZ-FIT™, purified water.

I. INTRODUCCIÓN

Se dice que la industria farmacéutica nacional se encuentra en constante desarrollo, sobre todo en investigación científica para formular y elaborar productos de calidad. Asegurando que un producto farmacéutico cuente con las condiciones aptas para el consumo humano, se exige que los equipos, métodos analíticos, procesos de fabricación y limpieza, se encuentren validados, previniendo de esta manera la contaminación cruzada. ⁽¹⁾

Los parámetros de cumplimiento en el control de calidad microbiológico son indispensables para garantizar que el producto farmacéutico tenga características de inocuidad complementando de esta manera lo que todo producto farmacéutico debe tener para un uso racional (eficacia, seguridad, calidad y accesibilidad) pueda en condiciones normales (práctica clínica habitual) ser utilizado para los efectos previstos. Para ello incluso la autoridad reguladora de nuestro país a través de las diferentes inspecciones de auditoría o control de cumplimiento de buenas prácticas en la cadena de suministros del medicamento aplica en diferentes circunstancias (Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas de Laboratorio, Buenas Prácticas de Almacenamiento, etc.).

La calidad de los productos farmacéuticos está asociada a diferentes factores, como IFA, excipientes, técnica de producción, etc. En los cuales incluso se considera ensayos de calidad según el titular del registro sanitario determine si se basa en una obra de referencia como farmacopea o en su defecto tiene una técnica propia (debidamente validada) para la aceptabilidad de los parámetros que evalúe en las diferentes etapas. Dentro de todos estos se encuentra el agua de uso farmacéutico utilizada como materia prima, ingrediente y disolvente en el procesamiento, formulación y fabricación de productos farmacéuticos. ⁽²⁾

El laboratorio obtiene el agua para uso farmacéutico a través de una filtración de agua potable en sistema de osmosis inversa. Este sistema consta de dos sub sistemas;

- Sistema de generación compuesto por: ablandadores, filtros, Lámpara UV, Membranas para osmosis inversa, desionizador, con sus respectivos puntos de muestreo para el control de especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas.
- Sistema de almacenamiento y loop de distribución hacia los puntos de uso con sus respectivos puntos de muestreo para el control de especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas.

El análisis microbiológico del agua en el laboratorio de caramelos farmacéuticos se realizaba por el método tradicional de filtración por membrana, la cual consistía en usar el equipo de filtración la cual se acoplaba al matraz kitazato y se conectaba a la bomba de vacío, luego se colocaba el filtro de membrana estéril sobre la superficie de la base del equipo y se procedía a agregar la muestra de agua. Luego de encender la bomba de vacío se esperaba hasta que toda la solución pase a través del filtro y finalmente se incubaba el filtro en medio agar, este procedimiento se realizaba por cada muestra de agua.

Razón suficiente, por la que el agua como ingrediente de una determinada formula, deba reunir características que le sean propias, según vengo describiendo a fin de que pueda ser empleada debidamente libre de microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *coliformes totales y fecales*, *Pseudomona aeruginosa*) y de cualquier tipo de contaminación que cause daño a la salud humana, debiendo cumplir con requisitos microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos para ser considerado apto para el consumo humano, estableciendo condiciones microbiológicas de calidad sanitaria e inocuidad. ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾

En el caso de los métodos analíticos microbiológicos estos deben demostrar un cumplimiento de aptitud, es decir deben ser corroborables según se haya elegido si alinearse a una farmacopea o modificar alguna circunstancia no contemplada en estas, debiendo verificarse o validarse según corresponda a la empresa demostrando que sus procedimientos y técnicas garantizan la calidad de sus productos. Normalmente estos ensayos se evalúan por la capacidad de

recuperación de crecimiento de colonias de bacterias, levaduras y hongos presentes en una muestra, mediante ensayos experimentales y la evaluación con herramientas estadísticas apropiadas de estos resultados. ⁽⁶⁾

El presente estudio se realizó para verificar que la implementación del método de filtración por membrana haciendo uso del sistema de filtración EZ- FIT™ que consta de una rampa de filtración de diseño exclusivo y pensada para el análisis en el laboratorio, optimiza el procedimiento de trabajo y disminuye el riesgo de contaminación. EZ-FIT™ es un dispositivo de filtración desechable, diseñado para optimizar y asegurar el flujo de trabajo del laboratorio para proporcionar resultados microbiológicos confiables y que ahorren tiempo. Después de la filtración de la muestra, el dispositivo se convierte en una placa petri.

1.1. Situación problemática

Para el análisis del agua purificada de uso farmacéutico, sobre todo de productos no estériles es necesario contar con un método que permita recuperar de manera eficiente la carga microbiana presente en la muestra de agua. Para lo cual la industria farmacéutica realiza o implementa métodos de aptitud para los métodos microbiológicos de filtración.

- Problema general:

¿El sistema de filtración EZ-FIT™, será más efectivo para la recuperación de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en agua purificada para uso farmacéutico que el método tradicional?

- Problema específico:

¿La tasa de recuperación bacteriana usando el sistema de filtración EZ-FIT™ es mayor que el método tradicional de filtración por membrana?

¿El sistema de filtración EZ-FIT™ logra reducir los riesgos de contaminación asociados al análisis de agua purificada para uso

farmacéutico presentes en el método tradicional de filtración por membrana?

1.2. Marco teórico referencial

Agua Purificada

Se utiliza como un excipiente en la producción de preparaciones no parenterales y en otras aplicaciones farmacéuticas, tales como la limpieza de ciertos equipos y componentes no parenterales en contacto con el producto, debe cumplir con los requisitos de pureza química, iónica, orgánica, y debe protegerse de la contaminación microbiana. Los sistemas de agua purificada que operan en condiciones ambientales son propensos a formar biopelículas de microorganismos que pueden ser fuente de niveles indeseables de endotoxinas o microorganismos viables en el agua. Estos sistemas de agua purificada requieren una frecuente higienización y monitoreo microbiológico para asegurar que el agua que alcanza puntos de uso tenga una calidad microbiológica apropiada. ⁽⁷⁾

Filtración por membrana

La técnica de filtración por membrana utiliza un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro (0.45 μm); esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los microorganismos de tamaño menor que el específico del poro pasan por la membrana o quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego esta es llevada a un medio selectivo, quien a través de intercambio metabólico y una incubación, evidencian el crecimiento de microorganismos y unidades formadoras de colonias. ⁽⁸⁾

Esta técnica es recomendada por la mayoría de las farmacopeas y envuelve la filtración de fluidos a través de un filtro de membrana estéril, cualquier microorganismo presente es retenido en la superficie del filtro.

También se pueden analizar sólidos solubles en agua, los cuales pueden ser disueltos en un diluyente apropiado y procesados por medio de esta técnica. La membrana debe sostenerse firmemente en una unidad de la filtración que consiste en una base de apoyo para la membrana. El aparato se diseña de forma que la solución a ser filtrada se puede introducir y filtrarse bajo las condiciones asépticas. Además, permite retirar asépticamente la membrana para transferirla al medio de cultivo o es adecuado para llevar a cabo la incubación dentro del aparato mismo después de agregar el medio. ⁽⁹⁾

Una membrana adecuada para las pruebas de esterilidad posee un tamaño de poro de 0,45 μm , un diámetro aproximado de 47 - 50 mm, y tiene un borde hidrofóbico o de baja retención de producto para minimizar la inhibición microbiana de los residuos que puedan quedar retenidos en la membrana. Si el producto no tiene sustancias inhibitoras puede usarse una membrana sin borde hidrofóbico, pero debe humedecerse antes de agregar la solución con el producto. Las membranas de nitrato de celulosa se usan para líquidos acuosos, aceites, y soluciones acuosas débiles; las membranas de acetato de celulosa, por ejemplo, se usan para soluciones alcohólicas fuertes. ⁽¹⁰⁾

El método de filtración por membrana empleando el Sistema EZ-FIT™ fue desarrollado por Merck Millipore, dicho sistema previene la formación de biopelícula porque cada uno de los componentes se pueden desmontar para facilitar su limpieza y esterilización en autoclave. El equipo de soporte del filtro consiste en un embudo de plástico estéril de un solo uso y membranas de filtración estériles reducen el mantenimiento y limita el riesgo de contaminación.

Unidad de filtración EZ-FIT™ es estéril, desechable y de un solo uso, para el análisis microbiológico agilizan su secuencia de trabajo, ahorran tiempo y proporcionan resultados de recuento microbiano muy fiables. Después de la filtración de la muestra, la membrana de 0,45 μm se puede transferir a una placa de medio agar para cultivar los

microorganismos. También se puede añadir el medio de cultivo líquido después de la filtración y el sistema se convierte en una placa Petri. La unidad de filtración EZ-FIT™ está diseñada para una recuperación óptima del microorganismo a evaluar, gracias a la forma del embudo y las propiedades hidrofóbicas del material que la constituye, reduciendo al mínimo los restos de la muestra, lo que asegura que todo el volumen de la muestra llega a la superficie de la membrana.

Las unidades de filtración EZ-FIT™ cumplen las normas internacionales (EP/USP/ISO) y el reglamento que rige el análisis del agua. El soporte de drenaje asegura la forma de la membrana para un perfecto contacto con el medio y una recuperación óptima de los microorganismos, protege la muestra de la contaminación durante el análisis. ⁽¹¹⁾

Microorganismos indicadores de la calidad en el agua

Los microorganismos que se utilizan como indicadores son los coliformes totales y fecales, éste último hace referencia a *Escherichia coli*, la cual es el indicador microbiológico preciso de la contaminación fecal en el agua para consumo. En la práctica, el análisis de la presencia de bacterias coliformes termo tolerantes puede ser una alternativa aceptable en muchos casos *Escherichia coli* es un indicador útil.⁽¹²⁾ Los resultados de este tipo de análisis se reportan como: unidades formadoras de colonias (UFC) en 100 mL de agua, o presencia/ausencia de microorganismos en 100 mL de agua. ⁽¹³⁾

Coliformes totales

Son bacterias gram negativas, no formadoras de esporas, oxidasa negativa y con forma de bacilo, que pueden crecer en medio aerobio y anaerobio facultativo en presencia de sales biliares y capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y aldehído para su interpretación se observa el crecimiento de colonias típicas color rosado a rojo con brillo metálico dorado después de una incubación de 48 horas a una temperatura de 36 +/- 2 ° C. Los coliformes totales son buenos indicadores microbianos de la calidad del agua. ⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

Coliformes fecales

Los coliformes fecales también denominados coliformes termo tolerantes porque soportan temperaturas de hasta 45°C, se pueden encontrar en el intestino humano y heces de animales, comprenden un grupo muy reducido de microorganismos los cuales son indicadores de calidad bacteriológica del agua. En su mayoría están representados por el microorganismo *Escherichia coli*, pero se pueden encontrar entre otros menos frecuentes *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*, estos últimos hacen parte de los coliformes termo tolerantes, pero su origen se asocia generalmente con la vegetación, y solo ocasionalmente aparecen en el intestino. Son microorganismos que fermentan la lactosa con producción de gas a 44° C ± 0.2 en un periodo de 24 a 48 horas. ⁽¹⁶⁾

Escherichia coli

Escherichia coli es miembro de la familia Enterobacteriaceae, es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del ser humano y los animales, se excreta diariamente con las heces. ⁽¹⁷⁾ Es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. ⁽¹⁸⁾ Desde hace tiempo se reconoce que los organismos del grupo coliformes son un buen indicador microbiano de la calidad del agua potable, debido principalmente a que son de fácil detección y se pueden enumerar en el agua. La presencia de *Escherichia coli* en muestras de agua potable, indica la existencia de fallas en la eficacia de tratamiento de aguas, en la integridad del sistema de distribución, y por tanto evidencia de contaminación de diferentes orígenes: suelo, superficies de agua dulce y tracto digestivo. ⁽¹⁹⁾

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo y agua. Puede

proliferar en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas propicias en contacto con el agua. *Pseudomonas aeruginosa* es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias y puede producir complicaciones graves. ⁽²⁰⁾

Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras *pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoníaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. ⁽²¹⁾

Los microorganismos de esta especie son ubicuos en el ambiente. Su presencia es común en suelos y en agua naturales como lagos y ríos en concentraciones desde 10/100 mL hasta > 1 000/100 mL, sin embargo, no es frecuente en agua potable y se detecta en ella en bajas concentraciones. Su presencia en agua potable está más relacionada con la capacidad de colonizar biopelículas en las tuberías de los sistemas de distribución y de hemodiálisis. Esta especie sobrevive en agua destilada y agua desionizada, además, puede encontrarse tanto en ambientes oligotróficos como en ambientes con alto número de nutrientes, como en aguas residuales. ^{(22) (23)}

Staphylococcus aureus

Es un coco gram positivo, aerobio o anaerobio, inmóvil, no esporulante, con actividad catalasa y coagulasa, que generalmente se dispone en racimos irregulares semejantes a los de uvas. El género *Staphylococcus* contiene al menos quince especies. Además de *Staphylococcus aureus*, las especies *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* también se asocian con enfermedades humanas. Aunque *Staphylococcus aureus* puede estar presente en aguas de consumo, no hay indicios de su transmisión por el consumo de estas aguas. A pesar de que los estafilococos son ligeramente más resistentes que *Escherichia coli* a las concentraciones de cloro residuales, su presencia

en el agua se controla con facilidad mediante procesos de tratamiento y desinfección convencionales. Dado que el material fecal no es su fuente habitual, el análisis de *Escherichia coli* (o bien de coliformes termo tolerantes) no es un índice adecuado de la presencia o ausencia de *S. aureus* en aguas de consumo. ⁽²⁴⁾

Laboratorio de caramelos farmacéuticos

Es una empresa peruana fundada por el Sr. Víctor Ravettino Flores en 1999, fruto del ímpetu de un grupo de accionistas nacionales, algunos de ellos con muchos años en el mercado farmacéutico. La empresa está dedicada a la fabricación y comercialización de caramelos farmacéuticos, que trabaja bajo los más altos estándares internacionales de calidad, sus productos cumplen plenamente con las normas de Buenas Prácticas de Manufactura, estas garantizan la producción de, medicamentos seguros y eficaces de alta calidad.

Cuenta con una moderna planta de fabricación ubicada en Lurín, se encuentra en un entorno seguro que garantiza no solo la producción eficaz en términos de calidad (Certificados BPM, BPL).

1.3. Estudios antecedentes

Estudios a nivel internacional

González B. y Toruño V. (2017), realizó en Nicaragua, un estudio sobre la “Evaluación de la calidad microbiológica del agua en bolsas comercializadas en los semáforos de la UCA a través del método de filtración por membrana Marzo – Abril del 2017”, tuvo como principal objetivo: evaluar la calidad microbiológica del agua purificada en bolsas comercializadas en los semáforos de la UCA a través del método de filtración por membrana. Según su metodología: se homogeniza 25 veces la muestra y se filtra 100mL, al finalizar se enjuaga la superficie interior del embudo filtrando de 20 a 30mL de agua estéril, se desconecta del vacío, se retira el filtro de membrana con una pinza

estéril y se coloca en la placa con medio de Agar m-endo, se incubaba a 35,0°C por 24 horas. Como resultado: se obtuvo coliformes totales en las muestras PCH con 56 ufc/100 mL y 94 ufc/100 mL en la marca FRS, coliformes termo tolerantes como PCH con 40 ufc/100 mL y para *E. coli* se obtuvieron resultados menores de <1 ufc/100 mL en las 5 muestras. Concluye: el método de filtración por membrana es eficaz debido a su sensibilidad y especificidad, tiene un mecanismo que permite que los microorganismos de un tamaño menor que el poro queden retenidos en la superficie de la membrana debido a su elevada velocidad de flujo. ⁽²⁵⁾

López K. (2015), realizó en Colombia, un trabajo sobre la “Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas”, tuvo como objetivo: Validar el método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* a coli en aguas marinas. Según su metodología: la filtración por membrana consistió en pasar un volumen conocido de agua, previamente diluido en 90 mL de agua destilada mediante un filtro estéril de 0,45 µm aplicando vacío, buscando retener células bacterianas de manera que quedaran homogéneamente distribuidas en el filtro de la unidad de filtración y luego colocarlas sobre el medio de cultivo, observando la detección simultánea de coliformes totales y *E. coli*, posteriormente se incubaron a una temperatura de 35±0.5°C por un periodo de 24 horas. Como resultado: Se evidenció que el método de filtración por membrana presentó diferencias significativas en el valor obtenido de la T de las dos muestras fue -0.610847 existiendo repetibilidad por lo tanto se establece que no hay diferencias significativas estadísticamente con un 95% de confianza, la reproducibilidad y pruebas con varianzas iguales. Concluyendo: que el método de filtración por membrana es repetible y reproducible por lo que es adecuado ser empleado en el análisis microbiológico de aguas marinas. ⁽²⁶⁾

Tijerina L. (2014), realizó en México, un estudio sobre la “Validación de un método basado en filtración por membrana para la detección de

patógenos bacterianos en melón, *Cucumis melo* y chile jalapeño, *capsicum annuum*, planteó como objetivo: Validación del método de filtración por membrana para la concentración y búsqueda de *Salmonella entérica L. monocytogenes* y *Escherichia coli* en productos vegetales como chile jalapeño y melón. Según su metodología, se comparó la eficiencia y la sensibilidad de un sistema de filtración por membrana y el sistema de esponja como método tradicional. Como resultado, mostraron que el método de filtración por membrana es mejor que el método de esponja siendo el límite de detección 2ufc para *Salmonella* y *E. coli* en chile jalapeño y melón. Con una sensibilidad, especificidad y eficacia relativa mayor a 98%. Concluyen que, el método de filtración por membrana es considerado como una buena opción para la detección de bacterias patógenas. ⁽²⁷⁾

Estudios a nivel nacional

Morales M. (2018), en Perú realizó la investigación titulada “Validación del examen microbiológico del bicarbonato de sodio y sulfadiazina de plata según USP vigente”, tuvo como objetivo: 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. Según su metodología: para la prueba de recuento microbiano del bicarbonato de sodio se realizó por el método de filtración por membrana, se pesó 10g del producto y se disolvió en un frasco con 90mL de bicarbonato, se filtra 100mL de la solución por el método de filtración de membrana de 0,45 µm, luego se inoculó aproximadamente de 10 – 100UFC de las cepas *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, luego se incubó a 30-35°C por 3 días y en una placa de DSA para el recuento de cepas *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* y se incubó a 20-25°C por 5 días al final de cada período de incubación se contaron las colonias obtenidas, este procedimiento se realizó por triplicado. Tuvo como resultado: exactitud entre 50-200% de

recuperación microbiana y precisión con valores $T > 0.05$ demostrando ausencia de diferencias significativas. Concluye: el método de filtración logra recuperar las concentraciones de microorganismos que se inoculan en la membrana, por lo que se considera adecuado para los análisis microbiológicos en agua. ⁽²⁸⁾

Obeso F. (2014), en Perú realizó la tesis titulada “Control de calidad de agua purificada para el uso en preparación de reactivos en el área de control de calidad del laboratorio farmacéutico Markos S.A.”, tuvo como objetivo: realizar el control de calidad del agua purificada para el uso en preparación de reactivos en el área de control de calidad en el laboratorio farmacéutico Markos S.A., tuvo como metodología realizar el método de filtración por membrana utilizando una membrana filtrante de 0,45 μm para el recuento total de microorganismos aerobios se filtró 1mL de agua purificada, luego se agregó 30mL de solución tamponada, con una pinza estéril se retiró la membrana filtrante y se colocó en la placa TSA y se incubó a 35,0°C por 3 días. Para *E. Coli* la membrana filtrante se colocó en agar Mac Conkey y para *P. aeruginosa* en agar cetrimide y se incubó a 35,0°C por 3 días. Obtuvo como resultado: ausencia de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* esto gracias a que el agua potable pasa por diferentes tratamientos para la obtención del agua purificada, siendo los resultados esperados permitiendo el cumplimiento de las especificaciones dadas por la farmacopea y la OMS. Concluye: que el agua purificada para uso en preparación de reactivos cumple en forma consistente y con las especificaciones microbiológicas para cada una de las pruebas de control de calidad. ⁽²⁹⁾

Liñán J. y Reynoso C. (2013), en Perú, realizó la investigación titulada “Análisis bacteriológico del agua de la fuente de abastecimiento y de jeringa triple de las unidades dentales de clínicas odontológicas en Tarma (Junín), periodo Octubre 2012 – Febrero 2013” tuvo como objetivo: Determinar la calidad bacteriológica del agua de la fuente de abastecimiento y de la jeringa triple utilizadas en las unidades dentales de las clínicas odontológicas de la ciudad de Tarma (Junín)”. Según su

metodología: desarrollaron los análisis de 30 muestras de agua potable; 25 muestras de jeringa triple y 5 muestras de la fuente abastecimiento a través del método de filtración por membrana, primero se midió en una probeta de 100mL la muestra de agua y se filtró, a través de una membrana filtrante de 0,45 μm , de la que se procedió a colocar en los medios correspondientes: coliformes totales, coliformes termo tolerantes (*Escherichia coli*), bacterias heterotróficas y *Pseudomona aeruginosa*. Después de la incubación se observaron las colonias características de cada medio utilizado. Tuvo como resultado: las muestras de jeringa triple obtuvo 88% de coliformes totales, 32% coliformes fecales, 20% bacterias heterotróficas, 16% *Pseudomona aeruginosa* y 8% *Escherichia coli*. Concluye: que mediante el método de filtración por membrana se detectaron bacterias presentes en el agua de la fuente de abastecimiento y de la jeringa triple. ⁽³⁰⁾

1.4. Importancia y justificación de la investigación

La Industria Farmacéutica, para estar facultada de fabricar, almacenar, comercializar y distribuir productos farmacéuticos, debe cumplir con la regulación sanitaria vigente, los cuales aseguran la calidad del producto farmacéutico.

El método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™ en análisis de agua purificada para uso farmacéutico permitirá a Laboratorio de caramelos farmacéuticos garantizar las condiciones necesarias para obtener resultados confiables y validar el desempeño del uso de la unidad de filtración y medios líquidos listos para su uso. Según datos de la OMS, el monitoreo de la calidad microbiológica del agua representa una pieza fundamental en la prevención de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua. En este trabajo se demuestra que el método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™ en análisis de agua purificada para uso farmacéutico es confiable, reduce costos y tiempo.

Los métodos analíticos que se aplican en el área de Control de calidad, pueden ser de referencia farmacopea y/o método propio, este último debe ser validado, tal como lo estipulan las Buenas Prácticas de Manufactura y las Buenas prácticas de Laboratorio, lo cual nos garantizan que los ensayos y resultados analíticos que se emitan aseguren la calidad del producto.

El método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™ es un método analítico de suma importancia, ya que nos dará una evidencia documentada con un alto grado de seguridad, que el análisis de agua purificada para uso farmacéutico nos proporcionará resultados confiables, que nos permita tomar decisiones en base a los resultados analíticos. Por lo antes expuesto, resulta muy importante, mediante este presente trabajo, implementar la técnica analítica.

1.5. Objetivo del estudio

1.5.1. Objetivo general:

- Comparar la implementación del método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™ en análisis de agua purificada para uso farmacéutico en Laboratorio de caramelos farmacéuticos.

1.5.2. Objetivos específicos:

- Obtener la tasa de recuperación microbiana de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli* empleando el sistema de filtración EZ-FIT™.
- Demostrar la repetibilidad de la técnica analítica empleando el sistema de filtración EZ-FIT™.

1.6. Hipótesis de investigación

1.6.1. Hipótesis Verdadera o de trabajo:

- El método de filtración Ez-Fit™ logra recuperar entre el 85% y el 115% de los microorganismos inoculados en el agua purificada como control positivo.

1.6.2. Hipótesis Nula:

- El método de filtración Ez-Fit™ no logra recuperar entre el 85% y el 115% de los microorganismos inoculados en el agua purificada como control positivo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Enfoque y diseño

Enfoque: Orientación analítica, descriptiva

Diseño de Investigación: Observacional

2.2. Muestra

Agua purificada.

Cepas Microbiológicas; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 8739. Pellets de tercer pasaje.

2.2.1. Criterios de Inclusión:

- Agua purificada; debe cumplir con los requisitos de pureza química, iónica, orgánica y debe protegerse de la contaminación microbiana.
- Cepas microbiológicas, con fecha vigente, con pruebas de promoción de crecimiento, con certificado de calidad del proveedor.

2.2.2. Criterios de Exclusión:

Aquel que no cumpla las características señaladas en criterios de inclusión.

2.3. Variable de estudio

2.3.1. Variable Independiente:

- Agua purificada
- Control microbiológico

2.3.2. Variable Dependiente:

- Recuento microbiano de microorganismos: *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

2.3.3. Metodología

Se llevó a cabo en el área de control microbiológico de Laboratorio de caramelos farmacéuticos.

2.3.3.1. Materiales

- Tubos de ensayo estériles
- Pipeta graduada de 2 mL, 5 mL y 10 mL.
- Frasco de vidrio de 500mL.
- Frasco Roux estéril
- Pinzas estériles.
- Espátulas estériles
- Alcohol 96%.
- Asa de siembra
- Tips estériles de 100-1000 µL estériles
- Guantes estériles
- Sistema de filtración
- Unidades de filtración

2.3.3.2. Reactivos/ Producto

REACTIVO / PRODUCTO	MARCA	LOTE	FECHA DE EXPIRA
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	MICROBIOLOGICS	483-829	2020-05-31
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027	MICROBIOLOGICS	484-1046	2020-09-30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	MICROBIOLOGICS	485-719	2019-12-31

<i>Medio liquido P. aeruginosa</i>	MERCK	A19015A	2019-12-31
<i>Medio liquido m-HPC/SPC</i>	MERCK	A19176	2021-05-11
<i>Medio liquido m-colibblue24 Broth</i>	MERCK	A19185	2020-11-17
<i>Agar TSA</i>	MERCK	223010	2020-01-18

2.3.3.3. Equipos

EQUIPO	MARCA	MODELO	CALIBRACIÒN
Incubadora	Merck	Ic55eco	ENERO-2019
Incubadora	Merck	Ic55eco	ENERO-2019
Cabina de bioseguridad	Labconco	Logic	ENERO-2019
Refrigeradora	Daewoo	Fr-146r/rs	ENERO -2019
Autoclave	All american	25x-2	ENERO-2019
Autoclave	Daihan	Maxterile 100r	ENERO-2019
Micropipeta 100 – 1000 µl	Brand	--	ENERO -2019

2.3.4. Preparación de material pre muestreo

- Los frascos schott de 500mL de capacidad, fueron autoclavados a 121°C y 15 PSI por 15 minutos.
- Toma de muestra: Se tomaron muestras de agua purificada en un frasco schott de 500 mL y se llevaron en un recipiente herméticamente cerrado hacia el área de recepción de muestras para análisis microbiológico.

- Las muestras fueron llevadas al área de microbiología: se colocaron en la cabina de bioseguridad clase A2, en el cual se realizó todo el proceso de filtración por membrana para asegurar la no contaminación de las muestras.
- Las cepas que se usaron son cepas de trabajo de tercer pasaje (kit Ez-Accu SHOT™).
- Se prepararon tres concentraciones de microorganismos ATCC:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Escherichia coli ATCC 8739

2.3.4.1. Preparación *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Concentración N°1:

- Se abrió la bolsa de papel aluminio y se retiró el frasco con ayuda de una pinza estéril un gránulo liofilizado.
- Se transfirió 1 gránulo al frasco de líquido hidratante de 1,2 mL.
- Se agitó el material hidratado con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 55ufc/0.1mL.

Concentración N°2:

- Se preparó a partir de la concentración N°1, extrayendo 0.1mL y transfiriendo en 0.9mL de solución hidratante.

- Se agitó con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 5ufc/0.1mL.

Concentración N°3:

- Se preparó a partir de la concentración N°2, extrayendo 0.2mL y transfiriendo en 0.8mL de solución hidratante.
- Se agitó con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 1ufc/0.1mL

<i>Pseudomona aeruginosa ATCC 9027</i>	
Concentración	ufc/0.1mL
Concentración N°1	55 ufc/0.1mL
Concentración N°2	5 ufc/0.1mL
Concentración N°3	1 ufc/0.1mL

2.3.4.2. Preparación *Staphylococcus aureus* ATCC6538

Concentración N°1:

- Se aperturó la bolsa de papel aluminio y retirar el frasco con ayuda de la pinza estéril un gránulo liofilizado.
- Se transfirió 1 gránulo al frasco de líquido hidratante de 1,2 mL.
- Se agitó el material hidratado con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió

completamente y la suspensión fue homogénea.

- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 63ufc/0.1mL.

Concentración N°2:

- Se preparó a partir de la concentración N°1, extrayendo 0.1mL y transfiriendo en 0.9mL de solución hidratante.
- Se agitó con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 6ufc/0.1mL.

Concentración N°3:

- Se preparó a partir de la concentración N°2, extrayendo 0.2mL y transfiriendo en 0.8mL de solución hidratante.
- Se agitó con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 1ufc/0.1mL.

<i>Staphylococcus aureus ATCC 6538</i>	
Concentración	ufc/0.1mL
Concentración N°1	63 ufc/0.1mL
Concentración N°2	4 ufc/0.1mL
Concentración N°3	1 ufc/0.1mL

2.3.4.3. Preparación *Escherichia coli* ATCC 8739

Concentración N°1:

- Se abrió la bolsa de papel aluminio y se retiró el frasco con ayuda de la pinza estéril un gránulo liofilizado.
- Se transfirió 1 gránulo al frasco de líquido hidratante de 1,2 mL.
- Se agitó el material hidratado con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 58ufc/0.1mL.










Concentración N°2:

- Se preparó a partir de la concentración N°1, extrayendo 0.1mL y transfiriendo en 0.9mL de solución hidratante.
- Se agitó con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 5ufc/0.1mL.

Concentración N°3:

- Se preparó a partir de la concentración N°2, extrayendo 0.2mL y transfiriendo en 0.8mL de líquido hidratante.
- Se agitó con ayuda del vórtex hasta que el gránulo se disolvió completamente y la suspensión fue homogénea.
- Repetir en 11 frascos y cada uno obtendrá 1ufc/0.1mL.

Escherichia coli ATCC 8739	
Concentración	ufc/0.1mL
Concentración N°1	58 ufc/0.1mL
Concentración N°2	5 ufc/0.1mL
Concentración N°3	1 ufc/0.1mL

<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
C1 =55ufc/0.1mL 1 granulo + 1.2mL de solución hidratante 	C1 =63ufc/0.1mL 1 granulo + 1.2mL de solución hidratante 	C1 =58ufc/0.1mL 1 granulo + 1.2mL de solución hidratante 
C2 =5ufc/0.1mL 0.1mL de C1 + 0.9mL de solución hidratante 	C2 =6ufc/mL 0.1mL de C1 + 0.9mL de solución hidratante 	C2 =5ufc/0.1mL 0.1mL de C1 + 0.9mL de solución hidratante 
C3 =1ufc/0.1mL 0.2mL de C2 + 0.8mL de solución hidratante 	C3 =1ufc/0.1mL 0.2mL de C2 + 0.8mL de solución hidratante 	C3 =1ufc/0.1mL 0.2mL de C2 + 0.8mL de solución hidratante 

Elaboración propia

Figura 1. Flujo de preparación de concentraciones de microorganismos ATCC

2.3.5. Siembra

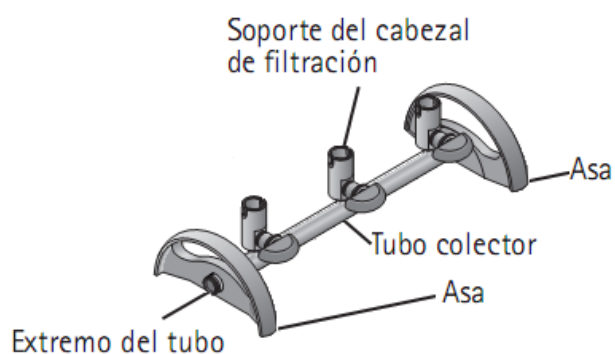
La siembra se realizó en dos placas; AGAR TSA y en la UNIDAD DE FILTRACIÓN.

- AGAR TSA: La siembra de las concentraciones N°1, 2 y 3 de los microorganismos ATCC se sembraron en las placas dentro de la cabina de bioseguridad.

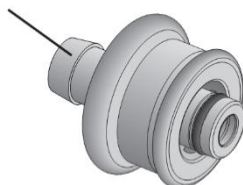
- UNIDAD DE FILTRACIÓN: La siembra de las concentraciones N°1, 2 y 3 de los microorganismos ATCC se sembraron dentro de la cabina de bioseguridad con el sistema de filtración EZ-FIT™.

Instalación del sistema de filtración:

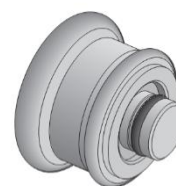
- ✓ Se instaló el sistema de filtración dentro de la cabina de bioseguridad,
- ✓ Se colocó el conector rápido en el extremo izquierdo verificando que la válvula de retención este orientada hacia afuera. Así mismo el tapón ciego rápido en la asa del extremo derecho.



Conexión a tubo flexible

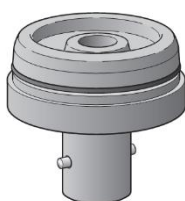


Conector rápido

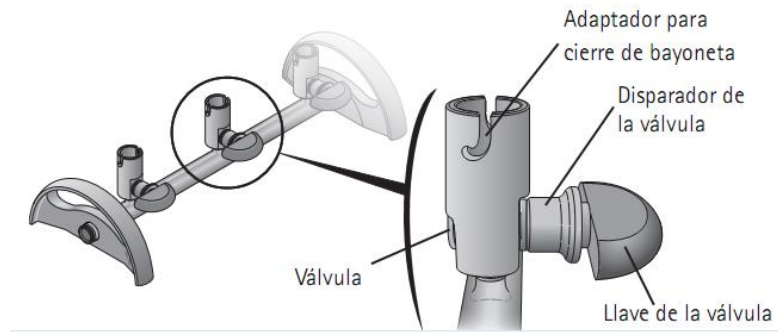


Tapón ciego rápido

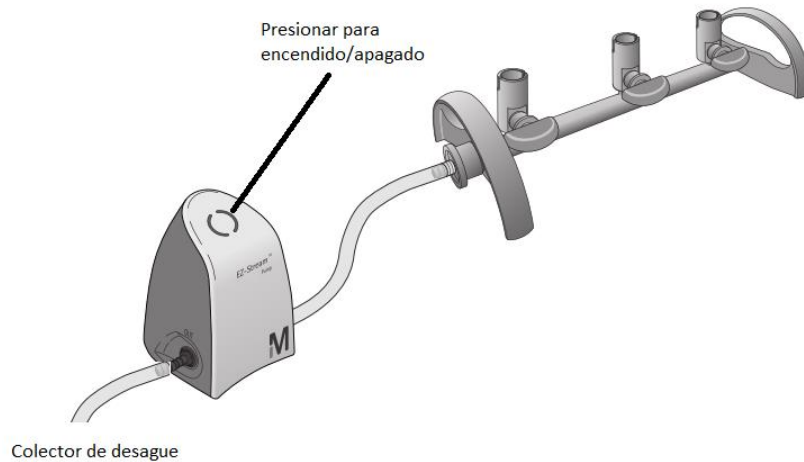
- ✓ Los cabezales en los soportes anclando en el adaptador para el cierre de bayoneta.



Cabezal de filtración



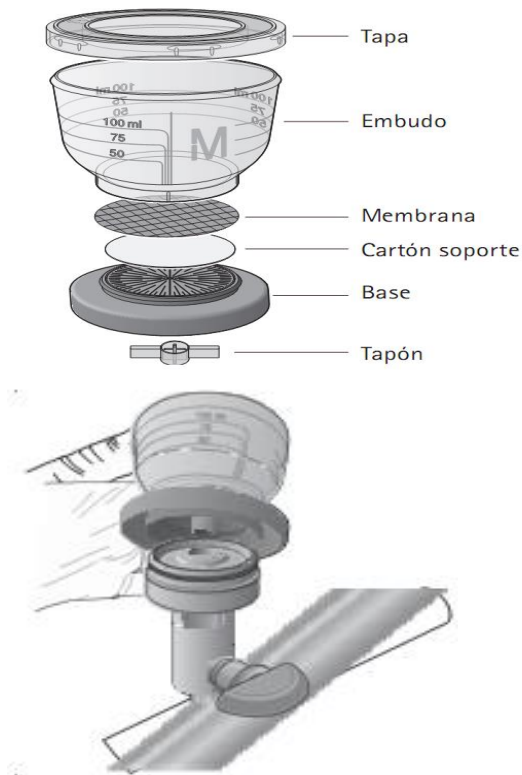
- ✓ Se conectó el tubo de silicona en el extremo donde se ubica el conector rápido. El otro extremo del tubo se adaptó a la bomba de vacío. De la bomba de vacío se coloca un tubo de silicona hacia el colector de desagüe.



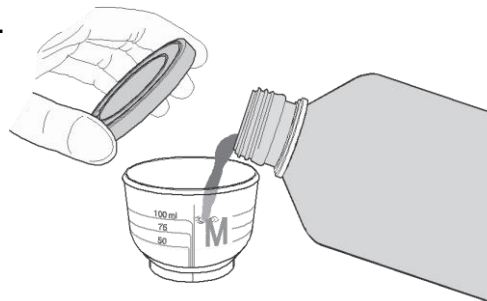
- ✓ Se colocaron los medios de cultivo líquidos (medio para recuento *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y heterotrófico) en un recipiente identificados y las unidades de filtración a emplear dentro de la cabina de bioseguridad.
- ✓ Se colocaron los frascos schott con muestras de agua purificada.

Filtración de muestras en unidad de filtración:

- ✓ Se retiraron las unidades de filtración del empaque estéril y fueron colocados en los cabezales del sistema de filtración EZ-FIT™ el cual va conectado a la bomba de vacío.



- ✓ Se adicionó la cantidad de muestra requerida para la filtración (100mL de agua purificada) en cada unidad de filtración.



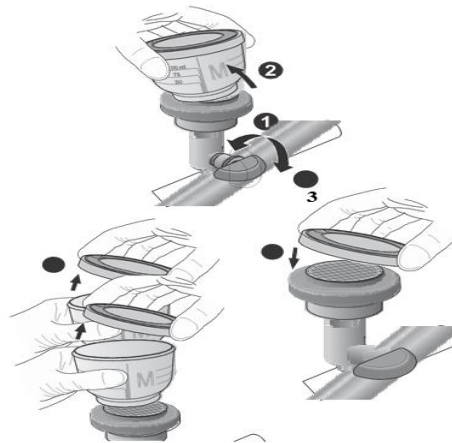
- ✓ Se colocó la tapa, se enciende la bomba de vacío y se giró la llave hasta la posición vertical para aplicar vacío y la muestra sea filtrada.



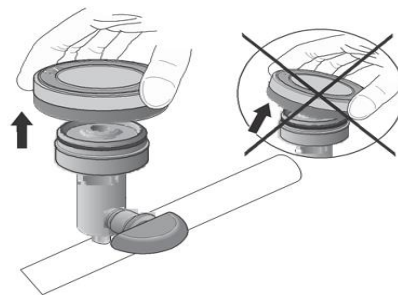
- ✓ Se procedió a transferir las concentraciones de los microorganismos ATCC en cada unidad de filtración.
- ✓ Se encendió la bomba de vacío para filtrar las muestras de agua.
- ✓ Se adicionó los medios de cultivo líquido correspondiente para cada microorganismo ATCC a investigar y encender la bomba de vacío para que los medios líquidos sean absorbidos por los filtros de 0.45 μm y retenidos en la membrana.



- ✓ Se procedió a abrir y cerrar la válvula para cortar vacío.
- ✓ Se retiró el embudo del sistema de filtración y se tapó la base que contiene el filtro con la tapa de la unidad de filtración.



- ✓ Se retiró la base estirando hacia arriba.



- ✓ Al finalizar la filtración se apagó la bomba de vacío.

2.3.6. Incubación de muestras

AGAR TSA: Se incubaron las muestras correspondientes a las tres concentraciones evaluadas con las placas de Agar TSA, dentro de las incubadoras programadas a las condiciones de crecimiento adecuadas de forma invertida. A una temperatura de 32.5°C por 48 horas.

UNIDAD DE FILTRACIÓN: Se incubaron las muestras correspondientes a las tres concentraciones evaluadas en la unidad de filtración, dentro de las incubadoras programadas a las condiciones de crecimiento adecuadas para cada microorganismo con la membrana hacia abajo:

- ✓ Para el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* la temperatura de incubación es de 35°C por 48 horas.

- ✓ Para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* la temperatura de incubación es de 35°C por 48 horas.
- ✓ Para el crecimiento de *Escherichia coli* la temperatura de incubación es de 35°C por 24 horas.

2.3.7. Recuento de colonias

La lectura después del periodo de incubación se llevó a cabo dentro de la cabina de bioseguridad, dicho procedimiento fue repetido con cada uno de los microorganismos ATCC.

- La lectura en las placas AGAR TSA: se reportaron en ufc (unidades formadoras de colonias).

- La lectura en las unidades de filtración:
 - *P. aeruginosa*: Cumplido el período de incubación se procedió a contar el número de colonias de color amarillo en placas, y se expresa como ufc/0.1mL.

 - *S. aureus*: Cumplido el período de incubación se procedió a contar el número de colonias de color marrón transparente a ámbar claro y reportar ufc/0.1mL.

 - *E. coli*: Cumplido el período de incubación se procedió a contar el número de colonias de color azul y reportar ufc/0.1mL.

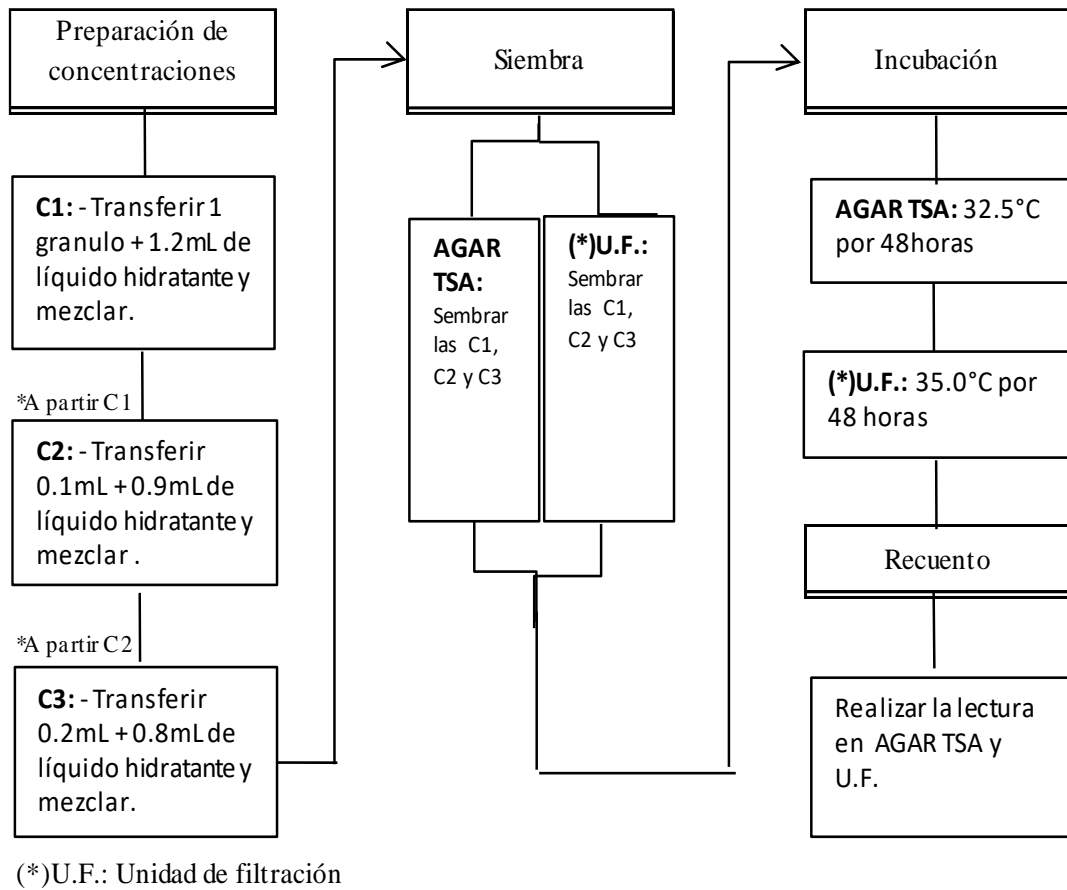


Figura 2. Diagrama de Flujo de Preparación de concentraciones, siembra, incubación y lectura.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.4.1. Técnica

Filtración por membrana.

2.4.2. Instrumentos de recolección de datos

Protocolo de validación, Manual sistema EZ-FIT™ programa SPSS 25, así mismo se realizan plantillas de Microsoft Excel. La recolección de datos se realizó mediante la lectura que se obtuvo de las placas de AGAR TSA y las unidades de filtración.

2.5. Proceso de recolección de datos

La recolección de datos se realizó mediante la lectura de las unidades formadoras de colonias que se obtuvieron en las placas de agar TSA y en las unidades de filtración.

2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos

Se cuenta con la autorización de Laboratorio V. Ravettino para realizar la implementación del método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ-FIT™ en análisis de agua purificada para uso farmacéutico.

La recolección de datos a través de la lectura de unidades formadoras de colonias (ufc) se realizará dentro de la cabina de bioseguridad.

2.5.2. Aplicación de instrumentos de recolección de datos

Se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2018, para realizar las plantillas.

Se usará la prueba estadística paramétrica t-student para determinar si existen diferencias entre las medias de los recuentos obtenidos en los métodos, siempre cumpliendo el supuesto de normalidad.

2.6. Métodos de análisis estadístico

Según la finalidad del análisis, los parámetros que se aplican son los siguientes:

2.6.1. Porcentaje de recuperación (Exactitud)

El porcentaje de recuperación se define como el porcentaje de microorganismos que son detectados por el método de prueba alternativo en comparación con el método compendio.

Capacidad de recuperación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{promedio de recuento obtenido}}{\text{promedio de recuentos realizado}} \times 100$$

Entre el control y test, se compararán sus medias, a fin de evidenciar diferencias significativas que permitan decir que cumplimos con los objetivos de implementación, es decir el método de filtración UF nuevo es mejor.

Los diferentes resultados se muestran a continuación, a partir de las tablas de valores obtenidos para ambos métodos.

2.6.2. Prueba T de student

La prueba T de student de dos muestras prueban la hipótesis de que no hay diferencia efectiva entre la media hipotética o media indicada de la población. Este procedimiento se basa en la distribución t, y para muestras pequeñas, funciona mejor si los datos fueron extraídos de distribuciones que son normales. ⁽³¹⁾

III. RESULTADOS

Se documenta los resultados obtenidos de los parámetros en el proceso de implementación demostrando que este método se realizó conforme a lo establecido.

1. Tablas

Tabla 1. Resultado del promedio y porcentaje de recuperación de *P. aeruginosa*

	C1 TSA	C1 UF	RESULTADO
PROMEDIO	50	50	CONFORME
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	90,73	91,10	CONFORME

Fuente: Elaboración propia

Los promedios obtenidos del microorganismo *P. aeruginosa* en medio TSA y unidad de filtración son iguales. Se cumple con el objetivo planteado de recuperación en medios TSA y unidad de filtración obteniendo resultados mayores a 70% de recuperación.

Tabla 2. Resultado del promedio y porcentaje de recuperación de *S. aureus*

	C1 TSA	C1 UF	RESULTADO
PROMEDIO	54	56	CONFORME
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	84,92	89,00	CONFORME

Fuente: Elaboración propia

Los promedios obtenidos del microorganismo *S. aureus* en medio TSA y unidad de filtración son iguales. Se cumple con el objetivo planteado de recuperación en medios TSA y unidad de filtración obteniendo resultados mayores a 70% de recuperación.

Tabla 3. Resultado del promedio y porcentaje de recuperación de *E. coli*

	C1 TSA	C1 UF	RESULTADO
PROMEDIO	51	53	CONFORME
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	87,93	91,38	CONFORME

Fuente: Elaboración propia

Los promedios obtenidos del microorganismo *E. coli* en medio TSA y unidad de filtración son iguales. Se cumple con el objetivo planteado de recuperación en medios TSA y unidad de filtración obteniendo resultados mayores a 70% de recuperación.

Tabla 4. Réplicas de repetibilidad del método de filtración para *Pseudomonas aeruginosa*

Recuento	C1		C2		C3	
	TSA	UF	TSA	UF	TSA	UF
1	47 ufc	52 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
2	55 ufc	52 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
3	47 ufc	47 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
4	55 ufc	54 ufc	5 ufc	5 ufc	1 ufc	1 ufc
5	51 ufc	48 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
6	49 ufc	49 ufc	5 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
7	49 ufc	54 ufc	5 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
8	51 ufc	46 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
9	48 ufc	49 ufc	4 ufc	5 ufc	1 ufc	1 ufc
10	47 ufc	50 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc

Fuente: Elaboración propia

Repetibilidad grado de acuerdo entre los resultados obtenidos en medidas sucesivas del mismo mesurando realizados en las mismas condiciones de medidas. Se calcula como $r=2,9$ es la desviación estándar de repetibilidad.

Tabla 5. Réplicas de repetibilidad del método de filtración para *S. aureus*

Recuento	C1		C2		C3	
	TSA	UF	TSA	UF	TSA	UF
1	53 ufc	52 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
2	52 ufc	46 ufc	3 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
3	51 ufc	54 ufc	4 ufc	3 ufc	1 ufc	1 ufc
4	51 ufc	59 ufc	3 ufc	3 ufc	1 ufc	1 ufc
5	52 ufc	63 ufc	3 ufc	3 ufc	1 ufc	1 ufc
6	63 ufc	65 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
7	48 ufc	59 ufc	4 ufc	3 ufc	1 ufc	1 ufc
8	55 ufc	57 ufc	3 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
9	50 ufc	54 ufc	3 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
10	60 ufc	52 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc

Fuente: Elaboración propia

Repetibilidad grado de acuerdo entre los resultados obtenidos en medidas sucesivas del mismo mesurando realizados en las mismas condiciones de medidas. Se calcula como $r=5,1$ es la desviación estándar de repetibilidad.

Tabla 6. Réplicas de repetibilidad del método de filtración para *E. coli*

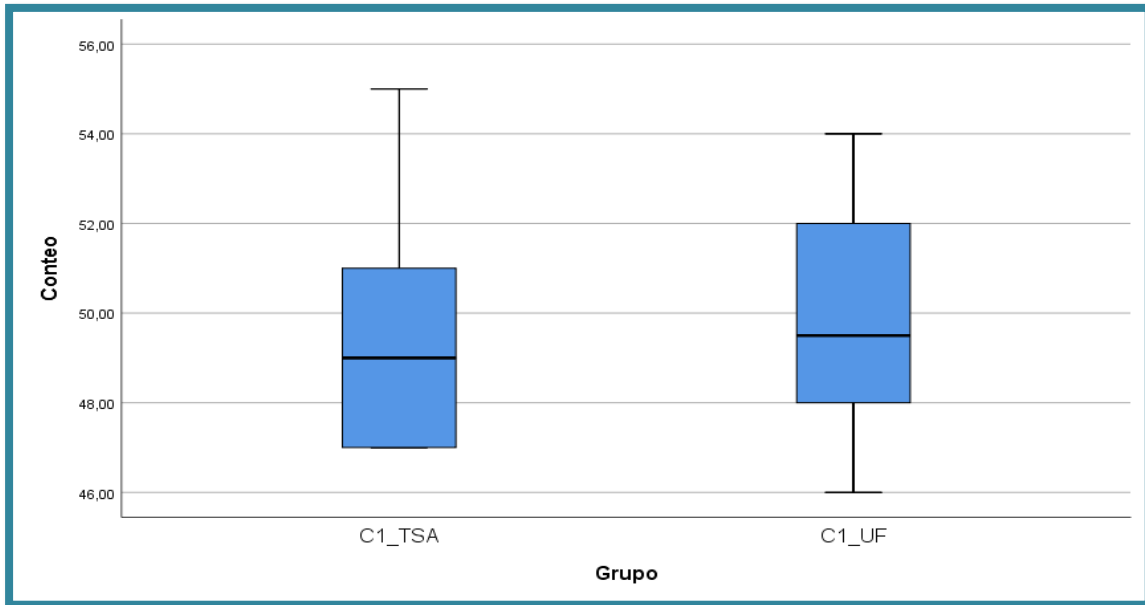
Recuento	C1		C2		C3	
	TSA	UF	TSA	UF	TSA	UF
1	50 ufc	52 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
2	58 ufc	52 ufc	5 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
3	49 ufc	47 ufc	5 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
4	52 ufc	54 ufc	4 ufc	5 ufc	1 ufc	1 ufc
5	45 ufc	48 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
6	44 ufc	49 ufc	4 ufc	5 ufc	1 ufc	1 ufc
7	53 ufc	54 ufc	4 ufc	5 ufc	1 ufc	1 ufc
8	56 ufc	46 ufc	5 ufc	5 ufc	1 ufc	1 ufc
9	51 ufc	49 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc
10	49 ufc	50 ufc	4 ufc	4 ufc	1 ufc	1 ufc

Fuente: Elaboración propia

Repetibilidad grado de acuerdo entre los resultados obtenidos en medidas sucesivas del mismo mesurando realizados en las mismas condiciones de medidas. Se calcula como $r=3,7$ es la desviación estándar de repetibilidad.

2. Figuras

Figura 3. Gráfica de caja de *P. aeruginosa* en medio TSA y Unidad de filtración



Fuente: Elaboración propia

Ho: Las medias de las ufc recuperadas son iguales

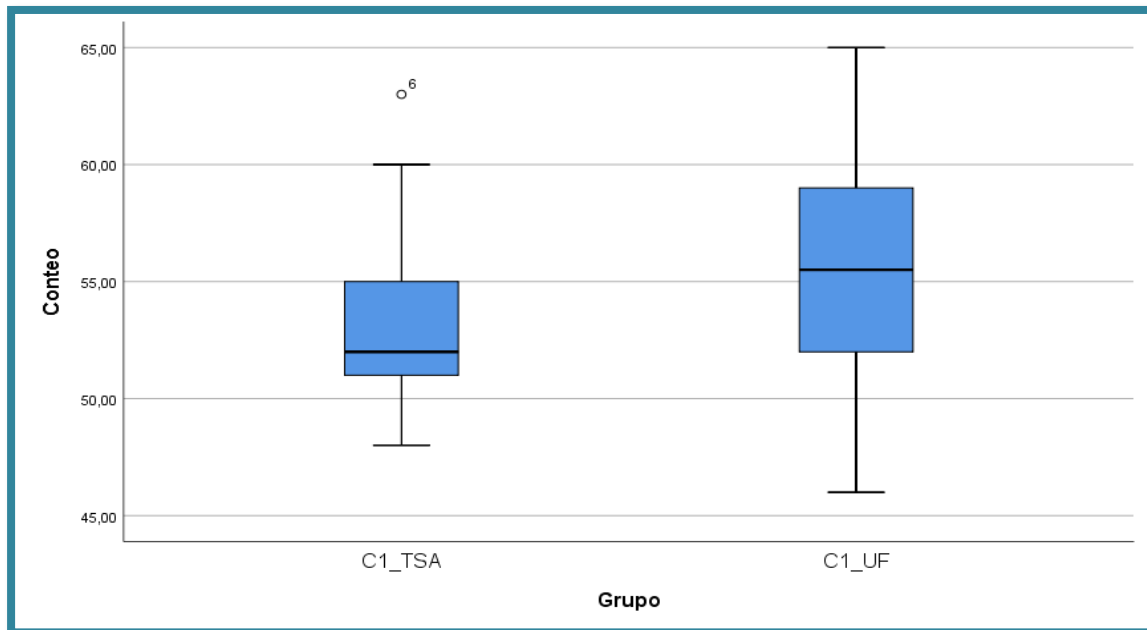
H1: Las medias de las ufc recuperadas son significativamente distintas

- Una condicional denominada "supuesto de normalidad" se debe cumplir para aplicar el t-student; por lo que usaremos el test que nos permita establecer este supuesto. No obstante, hay otros supuestos a cumplir, pero dada la pequeña cantidad de muestra (10) y la robustez de la normalidad, no es muy útil aplicar todos.

- La prueba de normalidad, realizada $p > 0.05$ (0,20) a través del test de Kolmogorov-Smirnov; nos permite realizar la t-student, siendo así que obtendríamos un resultado, hacia la aceptación de la hipótesis nula (Ho), es decir; con una $p = 0,88$ se determina que las medias de cada grupo no son significativamente distintas y la capacidad de recuperación de cultivos es muy marcada a la igualdad.

El contexto de decisión que tome la empresa, estaría enmarcado en los parámetros que establezcan sus procedimientos para este tipo de detalles, siendo la diferencia de rendimiento entre ambas de 0,37 %.

Figura 4. Gráfica de caja de *S. aureus* en medio TSA y Unidad de filtración



Fuente: Elaboración propia

Ho: Las medias de las ufc recuperadas son iguales

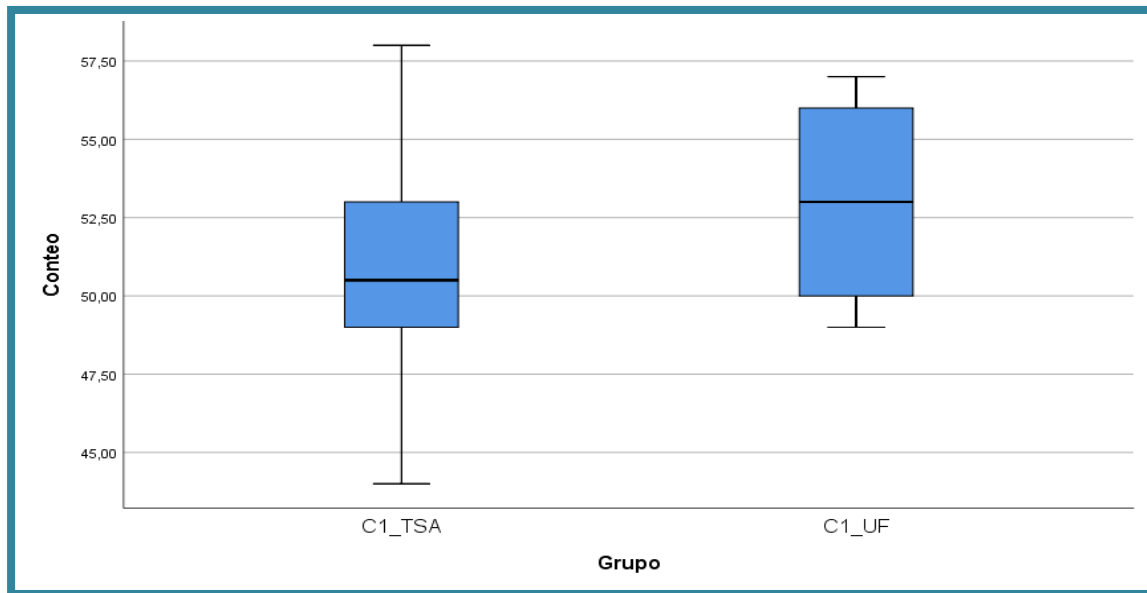
H1: Las medias de las ufc recuperadas son significativamente distintas

- Una condicional denominada "supuesto de normalidad" se debe cumplir para aplicar el t-student; por lo que usaremos el test que nos permita establecer este supuesto. No obstante, hay otros supuestos a cumplir, pero dada la pequeña cantidad de muestra (10) y la robustez de la normalidad, no es muy útil aplicar todos.

- La prueba de normalidad, realizada $p > 0.05$ (0,097) a través del test de Kolmogorov-Smirnov; nos permite realizar este test, siendo así que obtendríamos un resultado, hacia la aceptación de la hipótesis nula (Ho), es decir; con una $p = 0,277$ se determina que las medias de cada grupo no son significativamente distintas y la capacidad de recuperación de cultivos no es muy marcada.

El contexto de decisión que tome la empresa, estaría enmarcado en los parámetros que establezcan sus procedimientos para este tipo de detalles, asumiendo de todas formas que como el grupo de UF es ligeramente mayor, tendría mejor rendimiento, siendo la diferencia de rendimiento entre ambas de 4,08 %.

Figura 5. Gráfica de caja de *E. coli* en medio TSA y Unidad de filtración



Fuente: Elaboración propia

Ho: Las medias de las ufc recuperadas son iguales

H1: Las medias de las ufc recuperadas son significativamente distintas

- Una condicional denominada "supuesto de normalidad" se debe cumplir para aplicar el t-student; por lo que usaremos el test que nos permita establecer este supuesto. No obstante, hay otros supuestos a cumplir, pero dada la pequeña cantidad de muestra (10) y la robustez de la normalidad, no es muy útil aplicar todos.

- La prueba de normalidad, realizada $p > 0.05$ (0,20) a través del test de Kolmogorov-Smirnov; nos permite realizar el t-student, siendo así que obtendríamos un resultado, hacia la aceptación de la hipótesis nula (Ho), es decir; con una $p = 0,211$ se determina que las medias de cada grupo no son significativamente distintas y la capacidad de recuperación de cultivos no es muy marcada.

El contexto de decisión que tome la empresa, estaría enmarcado en los parámetros que establezcan sus procedimientos para este tipo de detalles, asumiendo de todas formas que como el grupo de UF es ligeramente mayor, tendría mejor rendimiento, siendo la diferencia de rendimiento entre ambas de 3,45 %.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Discusión

El Reglamento de la calidad de Agua para Consumo Humano N°031-2010-SA, establece que toda agua destinada para el consumo humano debe cumplir con los parámetros microbiológicos dentro de los cuales a nivel bacteriológico dictamina los ensayos de: bacterias coliformes totales, *E.coli*, bacterias termotolerantes y bacterias heterotróficas. ⁽³⁾

La técnica de filtración por membrana es adecuada para aguas que contienen poca materia orgánica en suspensión y proporciona un recuento directo de colonias en la superficie del filtro (ISO 8199, 2005).

En la presente investigación del método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ FIT™ se obtuvo un porcentaje de recuperación de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli* en medio agar TSA y unidad de filtración mayor a 70%, detallados en las tablas N°1, N°2 y N°3 como en los estudios de Morales M, 2018⁽²⁸⁾ dónde la recuperación microbiana fue entre 50-200% y Tijerina L. 2014⁽²⁷⁾, obtuvieron un porcentaje de recuperación por encima del 70%.

En la investigación de López K. 2015 ⁽²⁶⁾, determinó parámetros de repetibilidad donde las variables analizadas demostraron diferencias significativas, ya que el valor hallado de la T calculada está dentro de la zona de aceptación de hipótesis. La reproducibilidad fue de 95% de confianza y pruebas con varianzas iguales y el valor arrojado en la prueba T se encontró dentro de la región de aceptación de la hipótesis. En nuestro estudio se describe que en las tablas N°4, N°5 y N°6 la repetibilidad de los resultados obtenidos en las unidades de filtración cumplen con la concentración teórica.

En las figuras N°3, N°4 y N°5 se detalla que en nuestro estudio el $p > 0.05$ tanto en el medio de TSA y en la unidad de filtración no son significativamente distintas con un nivel de confianza del 95% encontrándose dentro del rango de aceptación, se compara con los

estudios de Morales M, 2018⁽²⁸⁾ que obtuvieron valores $p > 0.05$ demostrando ausencia de diferencias significativas.

La OMS, reconoce que los organismos del grupo coliforme son un buen indicador microbiano de la calidad de agua potable, debido principalmente a que son de fáciles de detectar y enumerar en el agua. La presencia de *E. coli* en las muestras indica la existencia de fallas en la eficacia de tratamiento de agua, integridad, sistema de distribución y por tanto es una evidencia de contaminación. ⁽¹⁴⁾ González B. y Toruño V. 2017 ⁽²⁵⁾, indican que el método de filtración por membrana es eficaz permitiendo que los microorganismos de un tamaño menor que el poro queden retenidos en la membrana. En nuestro estudio el equipo EZ FIT™ nos muestra un resultado eficaz ya que la membrana tiene un tamaño de poro de 0,45 μm capaz de retener microorganismos. Así como en los estudios de Liñán J, Reynoso C. 2013 ⁽³⁰⁾ realizó el análisis de agua potable usando una membrana filtrante de 0,45 μm .

Según APHA nos indica que la técnica de filtración por membrana se basa en un mecanismo mediante el cual se atrapa en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro 0.45 μm ; esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua, logrando así que esta se filtre. Los microorganismos de un tamaño menor que el poro pasa la membrana o quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana. ⁽⁸⁾

Obeso F. 2014⁽²⁹⁾ obtuvo resultados esperados en el análisis de agua indicando que se cumple con las especificaciones dadas por la farmacopea y OMS.

Los resultados demuestran que la técnica de filtración por membrana para evaluar el sistema EZ FIT™ es precisa, reproducible teniendo en cuenta que se realizó con diferentes concentraciones de microorganismos ATCC *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, además nos permite analizar volúmenes

relativamente grandes de muestra y proporciona resultados numéricos más rápidos que el método de tubos múltiples. ⁽⁹⁾

El manual de análisis de agua HACH refiere que el método de filtración por membrana permite de manera rápida y sencilla obtener un estimado de una población de microorganismos en agua, además de la gran utilidad de realizar varios análisis al día.

La calibración y mantenimiento de los equipos es un paso importante dentro de la metodología de la implementación, los equipos utilizados durante las diferentes pruebas realizadas se encontraban funcionando correctamente y dentro de los rangos esperados, por lo tanto se debe contar con un cronograma de mantenimiento preventivo vigente.

4.2. Conclusiones

Mediante la metodología aplicada se logró cumplir con los objetivos, al establecer la reproducibilidad y repetibilidad del método se demuestran que no hay diferencias significativas distintas entre los valores de las medias obtenidas lo que muestra que el método evaluado es preciso.

Se comprobó la efectividad del método de filtración obteniendo resultados confiables, como el porcentaje de recuperación que superó al 70% cumpliendo así en forma consistente y repetitiva los resultados. Demostrando que el método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ FIT™ es apropiado para el análisis de agua.

La implementación tuvo etapas importantes y necesarias que deben cumplirse para garantizar la confiabilidad de un método, equipo o proceso. Es importante tener evidencia que el método, equipo o proceso funcionan de acuerdo a lo esperado.

Se constató que el sistema de filtración EZ FIT™ en conjunto con la unidad de filtración proporcionan una mayor fiabilidad para el conteo de las unidades formadoras de colonias.

Se comprobó que con un tamaño de poro de 0.45 µm utilizados en la técnica de filtración por membrana retienen y recuperan satisfactoriamente los microorganismos. Demostrando que por medio de la filtración por membrana es capaz de detectar concentraciones a partir de 1 unidad formadora de colonia (ufc).

4.3. Recomendaciones

Se recomienda una vez determinado estos parámetros en la implementación (prueba de normalidad y repetibilidad) se debería complementar con la prueba de especificidad para asegurar resultados plenamente confiables.

Es importante el buen manejo del sistema de filtración EZ FIT™ durante el análisis de agua purificada, mediante la técnica de filtración por membrana por lo que se recomienda tener en cuenta el ajuste del equipo, la unidad de filtración y la misma manipulación del sistema para evitar cualquier contaminación cruzada.

Es fundamental el empleo de los microorganismos establecidos en la USP para la evaluación de controles positivos y así verificar la efectividad de la técnica de filtración por membrana.

Se recomienda trabajar con materiales de referencias como cepas ATCC las cuales nos garantiza que en la evaluación del sistema de filtración EZ FIT™ los resultados son confiables y reales.

Se recomienda utilizar inóculos con una concentración conocida de unidad formadora de colonia por mililitro con el fin de evitar variaciones muy grandes en los recuentos y por ende en los porcentajes de recuperación.

Se hace indispensable que las personas que ejecutan dicho método deben contar con el suficiente conocimiento y destreza para la ejecución correcta de la técnica de filtración por membrana.

Los materiales a emplearse en el proceso de implementación deberán tener un certificado de calibración con lo que se garantiza la calidad del material de trabajo en la implementación del método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración EZ FIT™.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Decreto supremo N°021-2018-SA Manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos.
2. OMS. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. N°957-2010.
3. Decreto supremo N°031-2010-SA. Reglamento de la calidad del agua para consumo humano.
4. Directiva Sanitaria N°908-2014-MINSA/DIGESA-V.01. Directiva Sanitaria para la formulación, Aprobación y Aplicación del plan de control de calidad (PCC) por los proveedores de agua para consumo humano.
5. OMS. Guías para la calidad del agua de consumo humano. Cuarta edición que incorpora la primera adenda. Ginebra 2011.
6. Decreto supremo N°017-2018-SA Manual de buenas prácticas de laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos)
7. USP 41 NF-36. Capítulos Generales [1231] Agua para uso farmacéutico. Octubre; pp.8318. 2018
8. APHA – AWWA - WPCF. Métodos normalizados para el análisis de Agua Potable y Residual. 17 Edición. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. pp: 1147. 2000.
9. Hugo W, Russell A. Pharmaceutical Microbiology 8th edition. Wiley Blackwell Science. Gran Bretaña. pp:376-378. 2011.
10. Australian G. Department of health and ageing therapeutic goods administration. TGA Guidelines for sterility testing of therapeutic goods. pp. 11-15. Australia. 2006
11. Manual Sistema *EZ-FIT*™. Alemania.2013
12. Manual de Microbiología aplicada a las industrias Farmacéuticas, cosmética y de productos médicos. Capítulo IV.1. Ensayos de esterilidad. Buenos aires. 2013.
13. Jordan M, Britto D. Evaluación de la calidad microbiológica del agua en producción pecuaria en municipios de Risaralda, Colombia-2017. [Tesis]. Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 2017.

14. OMS. Guía para la calidad del agua potable. Vol.1 Primer apéndice de la tercera edición. 2006
15. Tierra F. Evaluación la calidad física, química y microbiológica del agua de consumo humano de la parroquia de san luis, canton Riobamba, provincia de Chimborazo. . [Tesis]. Ecuador Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. 2015.
16. MILLIPORE. Análisis Microbiológico. Madrid, España. 2005.
17. Larrea-Murrell J. et aet Bacterias indicadoras de contaminación fecha en la evaluación de la calidad de las aguas. Rev CENIEC. Ciencias Biológicas, vol 44, N°3, 2013, pp 24-34.
18. Andino F, Castillo Y. Microbiología de los Alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. 2010
19. Rios S, Agudelo R, Gutiérrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Rev. Fac. Nac. Salud Pública. 2017
20. Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Publicado en nombre de la OMS. IWA Publishing. Londres (Reino Unido), 2003.
21. Victoria J, Galván M. Pseudomonas aeruginosa as an indicator of health risk in water for human consumption. Water Science and Technology Vol 43 N°12 pp49–52. IWA Publishing. Mexico. 2001.
22. González M, García M, Marine M. Importancia sanitaria de pseudomona aeruginosa en agua de hemodialisis y su desinfección. Instituto Nacional de Higiene Epidemiologia microbiología. Revista cubana de salud pública. 2014;40 (2). 201-214.
23. Martín I. Riesgo sanitario por presencia de pseudomona aeruginosa en el agua para consumo. Argentina. Tesis. Facultad de ecología urbana. Universidad nacional de general sarmiento. 2004
24. Antai SP. Incidence of Staphylococcus aureus, coliforms and antibiotic-resistant strains of Escherichia coli in rural water supplies in Port Harcourt. Journal of Applied Bacteriology. pp: 62:371– 375. 1987.

25. González B. y Toruña V, Evaluación de la calidad microbiológica del agua en bolsas comercializadas en los semáforos de la UCA a través del método de filtración por membrana Marzo-Abril del 2017. [Tesis]. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. 2017.
26. López K. Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y Escherichia coli en aguas marinas. Boletín científico CIOH. Colombia. 2015.
27. Tijerina L. Validación de un método basado en filtración por membrana para la detección de patógenos bacterianos en melón, cucumis melo (L. 1753) y chile jalapeño, capsicum annum (L. 1753) [Tesis]. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de ciencias biológicas; 2014.
28. Morales M. Validación del examen microbiológico del bicarbonato de sodio y sulfadiazina de plata según USP vigente. [Tesis]. Lima: Universidad Ricardo Palma. Facultad de ciencias biológicas; 2018.
29. Obeso F. Control de calidad de agua purificada para el uso en preparación de reactivos en el área de control de calidad del laboratorio farmacéutico Markos S.A. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional de trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2014.
30. Liñán J, Reynoso C. Análisis bacteriológico del agua de la fuente de abastecimiento y de jeringa triple de las unidades dentales de clínicas odontológicas en Tarma (Junín) [Tesis]. Lima: Universidad Norbert Wiener, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2013.
31. Protocolo de validación del Sistema Milliflex Quantum

Anexo A

MATRIZ DE CONSISTENCIA




Planteamiento de Problema	Objetivos	Hipótesis	Justificación	Variable	Tipo de Variables	Técnicas, instrumentos de recolección de datos
<p>General: ¿El sistema de filtración Ez-FIT™, será más efectivo para la recuperación de <i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> en agua purificada para uso farmacéutico que el método tradicional?</p> <p>Específico: ¿La tasa de recuperación bacteriana usando el sistema de filtración Ez-FIT™ es mayor que el método tradicional de filtración por membrana?</p> <p>¿El sistema de filtración Ez-FIT™ logra reducir los riesgos de contaminación asociados al análisis de agua purificada para uso farmacéutico presentes en el método tradicional de filtración por membrana?</p>	<p>General: - Comparar la implementación del método de filtración por membrana empleando el sistema de filtración Ez-FIT™ en análisis de agua purificada para uso farmacéutico en Laboratorio de caramelos y fármacos.</p> <p>Específico: -Obtener la tasa de recuperación bacteriana de <i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> empleando el sistema de filtración Ez-FIT™</p> <p>-Demostrar la repetibilidad de la técnica analítica empleando el sistema de filtración Ez-FIT™.</p>	<p>General: El método de filtración Ez-FIT™ logra recuperar entre el 85% y 115% de los microorganismos inoculados en el agua purificada como control positivo.</p> <p>Específico: El método de filtración Ez-Fit™ no logra recuperar entre el 85% y el 115% de los microorganismos inoculados en el agua purificada como control positivo.</p>	<p>Garantizar las condiciones necesarias para obtener resultados confiables y validar el desempeño del uso de la unidad de filtración y medios líquidos listos para su uso. Según los datos de la OMS, el monitoreo de la calidad microbiológica del agua representa una pieza fundamental en la prevención de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua.</p>	<p>Dependiente: Agua purificada Control microbiológico</p> <p>Independiente: Recuento microbiano de microorganismos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Variable cuantitativa longitudinal</p>	<p>-Filtración por membrana -Protocolo de validación. -Manual sistema EZ-FIT™ -Lectura de unidades formadoras de colonias en placa. -Registro en hojas de cálculo Microsoft Excel 2018.</p>

Anexo B

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Dimensión	Indicador	Valores	Criterios de medición	Tipo de Variable	Instrumentos
Variable independiente: - Agua purificada - Control microbiológico	Metodología analítica	Porcentaje de recuperación Repetibilidad Prueba T de Student	Recupera	Cuantificable	Variable independiente	Protocolo de validación del método analítico filtración por membrana. Plantillas de Microsoft excell. Lectura de unidades formadoras de colonias en las placas de agar TSA y unidades de filtración.
Variable dependiente: - Recuento microbiano de microorganismos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	Aptitud del método analítico	Cálculo del porcentaje de recuperación de los microorganismos ATCC <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> y <i>E.coli</i> detectados por el método de filtración.	No recupera		Variable dependiente	

ANEXO C: Certificado de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027

Microbiologics®	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-1046** Reference Number: ATCC® 9027™** Purity: Pure Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 55 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2020/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Kassandra L Hall Release Date: 2018/10/5
Macroscopic Features: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen. A second colony type may also be present as small, round, shiny colonies.	Performance Medium: SBAP
Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive Pseudomonas P Agar: positive (blue-green color diffusing into the agar) Growth at 42 C: positive
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product Insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p>	
 REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02	(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.
 TESTING CERT #2655.01	(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.
(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.	
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC.28	

 **Microbiologics®**
Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa
Reference #: ATCC® 9027™*
Catalog #: 0484
Lot #: 484-1046**
Expiration Date: 2020/9/30
(7) Mean Assay Value (MAV): 55 CFU per 0.1 ml
Standard Deviation: 5.5E+00
Coefficient of Variation: 10%
99% Confidence Interval of 5.3E+01 to 5.7E+01 CFU
* 95% Confidence Interval of 5.3E+01 to 5.7E+01 CFU

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







Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE


(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. The information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303


ANEXO D: Certificado de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-719** Reference Number: ATCC® 6538™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 63 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/12/31 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Stensvad Release Date: 2018/8/2
Macroscopic Features: Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present. A second colony type may be present a white, circular, entire, low convex, and beta hemolytic.	Performance Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.	
Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.	
Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.	
Individual products are traceable to a recognized culture collection.	
	(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiology, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.
	(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.
	(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC.286	

 **Microbiologics®**
Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus
Reference #: ATCC® 6538™*
Catalog #: 0485
Lot #: 485-719**
Expiration Date: 2019/12/31
(7) Mean Assay Value (MAV): 63 CFU per 0.1 ml
Standard Deviation: 8.1E+00
Coefficient of Variation: 13%
99% Confidence Interval of 6.0E+01 to 6.6E+01 CFU
95% Confidence Interval of 6.1E+01 to 6.5E+01 CFU

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

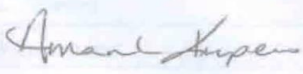




Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE


(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. The information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303


ANEXO E: Certificado de *Escherichia coli* ATCC 8739

Microbiologics®	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-829** Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 58 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2020/5/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kavitha Gobalan Release Date: 2018/6/8
Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, gray, mucoid, convex. Microscopic Features: Gram negative straight rod.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p>	
 <small>REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02</small>	<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small>
	<small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small>
 <small>TESTING CERT #2655.01</small>	<small>(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.</small>
<small>© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC.28</small>	

 **Microbiologics®**
Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Escherichia coli
Reference #: ATCC® 8739™*
Catalog #: 0483
Lot #: 483-829**
Expiration Date: 2020/5/31
(7) Mean Assay Value (MAV): 58 CFU per 0.1 ml
Standard Deviation: 8.1E+00
Coefficient of Variation: 14%
99% Confidence Interval of 5.6E+01 to 6.1E+01 CFU
95% Confidence Interval of 5.6E+01 to 6.0E+01 CFU

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


Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE

(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.

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

ANEXO F: Certificado de medio líquido *Pseudomonas aeruginosa*



EMD Millipore Corporation
Billerica, MA 01821
www.emdmillipore.com

Certificate of Analysis

Page 1

COMMODITY: **Pseudomonas Liquid Media, Ampoule, 2mL**
COMMODITY NUMBER: **MBA000P2P** MANUFACTURE DATE:
LOT NUMBER: **A19015A** 1/17/2019

DATE OF ANALYSIS:
1/16/2019

<i>TEST</i>	<i>SPECIFICATIONS</i>	<i>RESULTS</i>
Typical colonies produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC#27853). Countable number of colonies per plate.	85 to 115 %	107.0 %
pH of the solution	6.9 to 7.3	7.10
Sterility Check: No growth or color change after an incubation at 35oC for 48 hours.	To Pass	Passed

The expiration date is Jan 2, 2020

ANEXO G: Certificado de medio líquido m-HPC/SPC



EMD Millipore Corporation
Billerica, MA 01821
www.emdmillipore.com

Certificate of Analysis

Page 1

COMMODITY: **HPC/SPC Liquid Media Ampoule, 2 mL**
COMMODITY NUMBER: **MHA000P2S** MANUFACTURE DATE:
LOT NUMBER: **A19176** 7/1/2019

DATE OF ANALYSIS:
7/1/2019

<i>TEST</i>	<i>SPECIFICATIONS</i>	<i>RESULTS</i>
Typical colonies produced by <i>Escherichia coli</i> (ATCC# 25922). Countable number of colonies per plate when compared to m-TGE/TTC.	85 to 115 %	95.0 %
Typical colonies produced by <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC#12228). Countable number of colonies per plate when compared to m-TGE/TTC.	85 to 115 %	109.0 %
pH of the broth.	6.9 to 7.3	6.91
Sterile, no viable bacteria are present.	To Pass	Passed

The expiration date is Jun 10, 2020

Certified by _____

Scott Als
Analytical Services Chemist

ANEXO H: Certificado de medio líquido m-ColiBlue24



EMD Millipore Corporation
Billerica, MA 01821
www.emdmillipore.com

Certificate of Analysis

Page 1

COMMODITY: **m-ColiBlue24® Broth**
COMMODITY NUMBER: **2749950**
LOT NUMBER: **A19185**

MANUFACTURE DATE:
6/27/2019

DATE OF ANALYSIS:
7/1/2019

TEST

SPECIFICATIONS

RESULTS

Color of solution is blue.	To Pass	Passed
Typical bacterial growth. Blue purple colonies formed by Escherichia coli and red colonies formed by Enterobacter cloacae. 20 80 colonies per plate and all plates within 20% of average.	To Pass	Passed
Recovery of standard bacterial cultures in comparison to a prior lot (E. coli colonies, ATCC# 25922).	80 to 120 %	106.0 %
Recovery of standard bacterial cultures in comparison to a prior lot (Enterobacter cloacae colonies, ATCC# 23355).	80 to 120 %	98.0 %
Recovery of standard bacterial cultures in comparison to a prior lot (Klebsiella colonies, ATCC#13883).	80 to 120 %	101.0 %
Poor or no growth of Pseudomonas aeruginosa, ATCC#, 27853.	To Pass	Passed
pH of the solution	6.8 to 7.2	7.07
Sterile, no viable bacteria are present.	To Pass	Passed

ANEXO I: Certificado de medio agar TSA

Millipore

www.sigmaaldrich.com

Certificate of Quality Tryptic Soy Agar – ICR 30ml

Catalogue Number : 1.46001.0120
Lot Number : 223010
Storage Conditions : +15°C to +25°C

We certify that the product described herein meets the following criteria.

Product Application

Settle plates filled with Tryptic Soy agar, designed for the determination of the total aerobic microbial count in air via active or passive air monitoring as well as fingerprints of personnel in Isolators and Clean Rooms. This product is Gamma irradiated.

Typical Composition per Liter

Casein Peptone: 15g
NaCl: 5g
Soy peptone: 5g
Agar: 15g

This medium can be adjusted and/or supplemented according to EP/JP/USP to meet with the performance criteria required.

ISO® 9001 / 14001

This product was manufactured in a Millipore SAS facility whose Quality Management System and Environmental Management program are approved by an accredited registering body to ISO 9001 Quality System Standard and to the appropriate ISO 14001 System Standard, respectively.

Pharmacopoeia

Complies, where applicable, with Japanese (JP), European (EP) and US (USP) Pharmacopoeia recommendations, including the following chapter: EP 2.6.12, USP <61>, JP4.05 part 1.

Animal Origin

Material	Species	Country
Casein peptone	Bovine	AUS, NZ
	Porcine	USA, CA, FR
Tryptic soy agar	Bovine	AUS, NZ
	Porcine	USA, CA

Any provided animal origin composition data are for information purposes only and may be subject to change at any time in alignment with EMA410/01.

Lot Analysis

This lot was sampled, tested and released by Quality Assurance for compliance with the following characteristics:

Media Analysis

Criteria	Specifications	Results
Appearance	Clear, yellowish	Conform
pH	7,1 to 7,5	Conform
Dose of Irradiation	9 – 20 kGy	Conform
Filling volume	29 – 32g	Conform
Bar Code Test	Readable	Conform

The gel strength is measured for internal monitoring, enabling adjustment for consistent product performance.

Sterility control

Representative samples were subjected to a sterility test by direct incubation of the pre-filled plates.

Growth Promotion Tests

Tests were conducted by direct inoculation of the media. All the samples provided good growth and typical colony morphology.

Strain	Incubation conditions
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538	20-24h at 30-35°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	44-48h at 30-35°C
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404	

According to the above results, the product complies with Millipore SAS's acceptance criteria and is released.

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

Head of Biomonitoring Quality, Molsheim France

©2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.
ISO is a Registered Trademark of the International Organization for Standardization.
ATCC is a Registered Trademark of the American Type Culture Collection.

The vibrant M, Sigma-Aldrich and Millipore are trademarks of Merck, KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

The Life Science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S and Canada.

N° ManGo template 20341412 Version: 2.0 / (N° ManGo certificate 20382747 Version 1.0)



Millipore SAS
 CS n°49222
 F-67129 Molsheim
 Cedex
 Tél.:+33 (0)3 90 46 90 00 Fax:
 Fax:+33 (0)3 90 46 91 90



Certificate of Analysis

Page 1 of 1

Issue Date : 29/05/2019
 Article Number : 1460010120
 Article Description : Tryptic Soy Agar – ICR 30ml 03075e-120p
 Batch Number : 223010
 Expiration Date: 18/01/2020
 Date of manufacture: 24/04/2019
 Batch Status: Released
 By : Yoann MAINGUY

TEST	SPEC	RESULTS
	pH 7.1 to 7.5	7.3

TEST	SPEC	RESULTS
Aspergillus brasiliensis ATCC16404 at 32,5°C	50 to 200%	78%
Candida albicans ATCC10231 at 32,5°C	50 to 200%	110%
Inoculum Aspergillus brasiliensis ATCC16404 at 32,5°C	10 to 100 CFU	27CFU
Inoculum Candida albicans ATCC10231 at 32,5°C	10 to 100 CFU	49CFU
Inoculum Staphylococcus aureus ATCC6538	10 to 100 CFU	46CFU
Staphylococcus aureus ATCC6538	50 to 200%	98%
Bacillus subtilis ATCC6633	50 to 200%	78%
Inoculum Bacillus subtilis ATCC6633	10 to 100 CFU	55CFU
Inoculum Pseudomonas aeruginosa ATCC9027	10 to 100 CFU	47CFU
Pseudomonas aeruginosa ATCC9027	50 to 200%	115%

TEST	SPEC	RESULTS
Sterility control	No Growth	Conforms
Appearance	Clear, yellowish	Conform

Yoann Mainguy
 Quality Supervisor

Millipore SAS
 CS n°49222
 F-67129 Molsheim Cedex
 Tél.:+33 (0)3 90 46 90 00
 Fax: +33 (0)3 90 46 91 90

N° Siret 434 691 192 00018
 APE 2829B
 Capital 13688350 €
 R.C.S Saverne T1434691192
 N°TVA FR59 434 691 192

www.merckgroup.com

ANEXO J: Certificado de calibración de incubadora

MSG SOLUCIONES INTEGRALES		MULTI SERVICE GROUP		Edición 00 - Mayo 2018 Pag 1 de 9	
		MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L.			
<h3>Certificado de Calibración</h3> <h4>CIT19-0018</h4>					
ORDEN DE TRABAJO	:	OT19-0024	<p>El presente Certificado de Calibración evidencia la trazabilidad del proceso de calibración con patrones Nacionales o Internacionales, los cuales representan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).</p> <p>MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. como organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte ejecuta servicios de calibración a la vez que calibra y mantiene sus patrones de referencia con la finalidad de garantizar la trazabilidad de las mediciones.</p> <p>Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones, el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.</p> <p>La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición, que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre de la Medición". Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95%.</p> <p>Los resultados reportados son válidos para las condiciones y momento en que se realizó la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la recalibración.</p> <p>MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. no se responsabiliza por cualquier daño derivado del uso inadecuado del equipo calibrado, así como de una incorrecta interpretación de los resultados del presente certificado.</p>		
CLIENTE	:	V. RAVETTINO S.R.L.			
DIRECCIÓN	:	CAR. ANTIGUA PANAMERICANA SUR 2000 A.H. NUEVO LURIN - LURIN			
EQUIPO CALIBRADO	:	INCUBADORA			
MARCA / FABRICANTE	:	MMM GROUP			
MODELO	:	IC55ECO			
SERIE	:	H181468			
PROCEDENCIA	:	GERMANY			
IDENTIFICACIÓN	:	CC-INC-06			
VENTILACIÓN	:	NATURAL			
UBICACIÓN	:	ZONA DE INCUBADORAS			
LUGAR DE CALIBRACIÓN	:	CONTROL DE CALIDAD - ZONA DE INCUBADORAS			
FECHA DE CALIBRACION	:	2019-01-24			
FECHA DE EMISION	:	2019-01-26			
Sello	Fecha	Responsable Técnico	Metrólogo a cargo		
	2019-01-26	 Dante Abelino Perez	 Brando Quispe Castañeda		
<small>PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN DE ESTE DOCUMENTO SALVO AUTORIZACIÓN EXPRESA DE MSG. Jr. Las Gravas Nro. 1853 Urb. Flores 78 - Lima 36 Telf: 01 682 4729 / RPC: 992 367 283, 992 019 094 operaciones@msgperu.com / metrologia@msgperu.com / ventas@msgperu.com / www.msgperu.com</small>					

Certificado de Calibración

CIT19-0019

ORDEN DE TRABAJO : OT19-0024

CLIENTE : V. RAVETTINO S.R.L

DIRECCIÓN : CAR. ANTIGUA PANAMERICANA SUR 2000 A.H. NUEVO LURIN - LURIN

EQUIPO CALIBRADO : INCUBADORA

MARCA / FABRICANTE : MMM GROUP

MODELO : IC55ECO

SERIE : H182157

PROCEDENCIA : GERMANY

IDENTIFICACIÓN : CC-INC-07

VENTILACIÓN : NATURAL

UBICACIÓN : ZONA DE INCUBADORAS

LUGAR DE CALIBRACIÓN : CONTROL DE CALIDAD - ZONA DE INCUBADORAS

FECHA DE CALIBRACION : 2019-01-24

FECHA DE EMISION : 2019-01-26

El presente Certificado de Calibración evidencia la trazabilidad del proceso de calibración con patrones Nacionales o Internacionales, los cuales representan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).


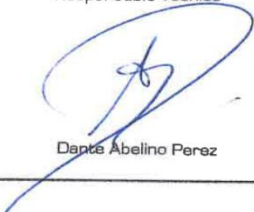

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. como organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte ejecuta servicios de calibración a la vez que calibre y mantiene sus patrones de referencia con la finalidad de garantizar la trazabilidad de las mediciones.

Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones, el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.

La Incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición, que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre de la Medición". Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95%.

Los resultados reportados son válidos para las condiciones y momento en que se realizó la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la recalibración.

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. no se responsabiliza por cualquier daño derivado del uso inadecuado del equipo calibrado, así como de una incorrecta interpretación de los resultados del presente certificado.

<p>Sello</p> 	<p>Fecha</p> <p>2019-01-26</p>	<p>Responsable Técnico</p>  <p>Dante Abelino Perez</p>	<p>Metrólogo a cargo</p>  <p>Brando Guispe Cestañeda</p>
--	--------------------------------	---	---

ANEXO K: Certificado de verificación de cabina de Bioseguridad



PRUEBAS DE CAMPO DE CABINA DE BIOSEGURIDAD Informe de Pruebas No. 001-2019-CBS/Merck

Usuario: Laboratorio V. Ravettino S.R.L. Laboratorio de Microbiología Antigua Panamericana Sur Nro. 2000 LURIN LIMA	Cabina de Bioseguridad Clase II	Tipo A2
Marca LABCONCO	Modelo LOGIC + 30248	Serie No. 161032745 G

Pruebas	Procedimiento	Criterio de aceptación	Equipo/instrumento utilizado	Resultado	Conclusión
Velocidad de flujo de aire descendente Uniforme	En la superficie de trabajo se establece 24 puntos de medición, en un plano horizontal interior a 10 cm por encima del borde superior de la ventana de acceso.	Velocidad promedio 0.279 m/s +/- 0.025 Rango de velocidades permitidas 0.20 – 0.36 m/s	Medidor de Velocidad de Aire .TSl. VeloiCal. Serie 9535A1138001	0.28 m/s 0.24-0.33 m/s	Aprobado Aprobado
Velocidad de flujo de aire de ingreso Método Alternativo	Con la ventana-visor ubicada a una altura de 3.7" y el sensor del anemómetro a 3,25" del grillo, se toma 08 lecturas en el frente de la Cabina. cada lectura se multiplica por el factor de corrección 1 Pie2 (0.0929 m2) El promedio de estas se divide entre el área de la ventanilla 2.69 Pie2(0.24991 m2) (indicados por el fabricante), para obtener la velocidad promedio de ingreso calculada.	Velocidad calculada 0.533 m/s +/- 0.025	Medidor de Velocidad de Aire .TSl. VeloiCal. Serie 9535A1138001	0.5353 m/s	Aprobado
Fuga en filtros de suministro y escape	El aerosol PAO 4 se introduce por las rejillas de toma de aire de la cabina .Luego con el Fotómetro se realiza un monitoreo sobre la superficie de los filtros y de sus respectivos empaques.	El valor de la penetración en los filtros debe ser ≤ 0.01 %	Fotómetro para Aerosol y Generador de Aerosol. Air Techniques. series 22253 y 15249	≤ 0.01%	Aprobado
Patrones de flujo de aire: a) Flujo descendente	El humo se pasa de un extremo a otro de la Cabina, a lo largo de la línea central de la superficie de trabajo, a una altura de 10 cm por encima del borde superior de la abertura de acceso.		Generador de humo. S/S.	Aprobado	Aprobado
b) Retención del visor	El humo se pasa de un extremo a otro de la Cabina, 2.5 cm detrás del visor y a 15 cm de altura por encima del borde superior de la abertura de acceso. El humo se pasa a lo largo del perímetro de la abertura de acceso, aproximadamente a 3.8 cm fuera de la Cabina con especial atención en las			Aprobado Aprobado	Aprobado Aprobado

1



Merck Peruana S.A.

Av. Los Frutales 220, Urb. Monterrico Oeste A, Ate. Lima 03 - Perú

Casilla 4331

Tel: 0051 1 618-7500 | Fax: 0051 1 437-2955

www.merck.com.pe



c) Retención del perímetro de la abertura de acceso	esquinas y los bordes verticales. El humo se pasa por la parte superior interna de la ventana, a 5 cm de los lados y a lo largo de la parte superior del área de trabajo.						
d) Sellado del visor					Aprobado	Aprobado	
Cabina de Bioseguridad APROBADA							

Velocidades de flujo de aire descendente.

Fila de prueba	1	2	3	4	5	6	7	8
Posterior de la zona de trabajo	0.31	0.33	0.32	0.30	0.28	0.27	0.26	0.24
Medio de la zona de trabajo	0.32	0.30	0.28	0.29	0.26	0.26	0.25	0.24
Fronte de la zona de trabajo	0.33	0.30	0.30	0.31	0.29	0.27	0.25	0.25

Velocidad promedio: 0.28m/s.

Velocidades de flujo de aire de ingreso, área contraída de ventanilla.

Fila de prueba	1	2	3	4	5	6	7	8
m/s	1.50	1.48	1.45	1.43	1.42	1.43	1.43	1.41

Promedio general de las lecturas de velocidad construcción: 1.44 m/s

Factor de corrección: 1 ple2 o 0,0929 m2

Área de apertura de ventanilla en posición de Trabajo: 2.69 ple2 o 0.24991 m2

Valores reportados:

Dimensiones	Abertura de acceso de trabajo	Abertura Constreñida de acceso
Largo m	1.229872	1.229872
Altura m	0.2032	0.076
Área m2	0.24991	0.0929

Volumen calculada de aire de salida = 1.44 m/s x 0.0929 m2 = 0.13376 m3/s

Velocidad promedio de Ingreso calculada: 1.44 x 0.0929 m2 / 0.24991m2 = 0.5353 m/s

2



Merck Peruana S.A.

Av. Los Frutales 220, Urb. Monterrico Oeste A, Ate. Lima 03 - Perú
Casilla 4331

Tel: 0051 1 618-7500 | Fax: 0051 1 437-2955

www.merck.com.pe



Voltaje de línea	Control electrónico	Control electrónico	FECHA	Próxima Calificación
226 VAC	Establecido en fabrica enero 2016 Ajuste de motor 47 Velocidad promedio en RPM 969	Establecido 24 de enero 2019 Ajuste de motor 47 Velocidad promedio en RPM 955	24/01/2019	Enero 2020

Calificado por:

Ing. Lizandro Chuyacama Núñez
CIP 32894

Ing. Hebert Loayza Ch.
Field Service Manager
R&A - Life Science
Merck Peruana S.A.

3



Merck Peruana S.A.

Av. Los Frutales 220, Urb. Monterrico Oeste A, Ate. Lima 03 - Perú
Casilla 4331

Tel: 0051 1 618-7500 | Fax: 0051 1 437-2955

www.merck.com.pe

ANEXO L: Certificado de calibración de refrigeradora

MSG SOLUCIONES INTEGRALES MULTI SERVICE GROUP		Edición 00 - Mayo 2018 Pag 1 de 6	
		MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L.	
<h3>Certificado de Calibración</h3> <h3>CIT19-0023</h3>			
ORDEN DE TRABAJO	: OT19-0024	<p>El presente Certificado de Calibración evidencia la trazabilidad del proceso de calibración con patrones Nacionales o Internacionales, los cuales representan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).</p> <p>MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. como organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte ejecuta servicios de calibración a la vez que calibra y mantiene sus patrones de referencia con la finalidad de garantizar la trazabilidad de las mediciones.</p> <p>Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones, el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.</p> <p>La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición, que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre de la Medición". Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95%.</p> <p>Los resultados reportados son válidos para las condiciones y momento en que se realizó la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la recalibración.</p> <p>MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. no se responsabiliza por cualquier daño derivado del uso inadecuado del equipo calibrado, así como de una incorrecta interpretación de los resultados del presente certificado.</p>	
CLIENTE	: V. RAVETTINO S.R.L.		
DIRECCIÓN	: CAR. ANTIGUA PANAMERICANA SUR 2000 A.H. NUEVO LURIN - LURIN		
EQUIPO CALIBRADO	: REFRIGERADORA		
MARCA / FABRICANTE	: DAEWOOD		
MODELO	: FR-146R/RS		
SERIE	: TR186EB7400058		
PROCEDENCIA	: CHINA		
IDENTIFICACIÓN	: CC-REF-02		
VENTILACIÓN	: NATURAL		
UBICACIÓN	: ZONA DE INCUBADORAS		
LUGAR DE CALIBRACIÓN	: CONTROL DE CALIDAD		
FECHA DE CALIBRACION	: 2019-01-25		
FECHA DE EMISION	: 2019-01-26		
Sello	Fecha	Responsable Técnico	Metrólogo a cargo
	2019-01-26		
<p>PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN DE ESTE DOCUMENTO SALVO AUTORIZACIÓN EXPRESA DE MSG. Jr. Las Gravas Nro. 1853 Urb. Flores 78 - Lima 36 Telf: 01 682 4729 / RPC: 992 367 283, 992 019 094 operaciones@msg.com.pe / metrologia@msg.com.pe</p>			

ANEXO M: Certificado de calibración de autoclave

MSG SOLUCIONES INTEGRALES		MULTI SERVICE GROUP		Edición 00 - Enero 2013 Pag 1 de 5	
				MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L.	
<h1>Certificado de Calibración</h1> <h2>CIT19-0020</h2>					
ORDEN DE TRABAJO	:	OT19-0024	El presente Certificado de Calibración evidencia la trazabilidad del proceso de calibración con patrones Nacionales o Internacionales, los cuales representan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).		
CLIENTE	:	V.RAVETTINO S.R.L.	MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. como organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte ejecuta servicios de calibración a la vez que calibra y mantiene sus patrones de referencia con la finalidad de garantizar la trazabilidad de las mediciones.		
DIRECCION	:	CAR. ANTIGUA PANAMERICANA SUR NRO. 2000 A.H. NUEVO LURIN - LIMA.	Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones, el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.		
LUGAR DE CALIBRACION	:	AREA DE LAVADO DE MATERIALES Y AUTOCLAVES	La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición, que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre de la Medición". Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95%.		
EQUIPO	:	AUTOCLAVE VERTICAL	Los resultados reportados son válidos para las condiciones y momento en que se realizó la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la recalibración.		
MARCA	:	ALL AMERICAN	MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. no se responsabiliza por cualquier daño derivado del uso inadecuado del equipo calibrado, así como de una incorrecta interpretación de los resultados del presente certificado.		
MODELO	:	25X-2			
NUMERO DE SERIE	:	0013286			
IDENTIFICACION	:	CC-AUT-01			
FECHA DE CALIBRACION	:	2019-01-24			
FECHA DE EMISION	:	2019-01-26			
Sello	Fecha	Responsable Técnico	Metrólogo a cargo		
	2019-01-26	 Dante Abelino Pérez	 Branda Quispe Castañeda		
<small>PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN DE ESTE DOCUMENTO SALVO AUTORIZACIÓN EXPRESA DE MSG. Jr. Las Gravas Nro. 1853 Urb. Flores 78 - Lima 36 Telf: 01 682 4729 / RPC: 992 367 283, 992 019 094 operaciones@msgperu.com / metrologia@msgperu.com / ventas@msgperu.com / www.msgperu.com</small>					



MULTI SERVICE GROUP

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L.

Certificado de Calibración

CIT19-0021

ORDEN DE TRABAJO : OT19-0024

CLIENTE : V.RAVETTINO S.R.L.

DIRECCION : CAR. ANTIGUA PANAMERICANA SUR NRO. 2000 A.H. NUEVO LURIN - LIMA.

LUGAR DE CALIBRACION : AREA DE LAVADO DE MATERIALES Y AUTOCLAVES

EQUIPO : AUTOCLAVE VERTICAL

MARCA : DAIHAN SCIENTIFIC

MODELO : MAXTERILE 100R

NUMERO DE SERIE : 10003371791001

IDENTIFICACION : CC-AUT-03

FECHA DE CALIBRACION : 2019-01-25

FECHA DE EMISION : 2019-01-26

El presente Certificado de Calibración evidencia la trazabilidad del proceso de calibración con patrones Nacionales o Internacionales, los cuales representan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).


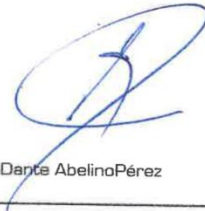

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. como organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte ejecuta servicios de calibración a la vez que calibra y mantiene sus patrones de referencia con la finalidad de garantizar la trazabilidad de las mediciones.

Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones, el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición, que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre de la Medición". Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95%.

Los resultados reportados son válidos para las condiciones y momento en que se realizó la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la recalibración.

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. no se responsabiliza por cualquier daño derivado del uso inadecuado del equipo calibrado, así como de una incorrecta interpretación de los resultados del presente certificado.

Sello	Fecha	Responsable Técnico	Metrólogo a cargo
	2019-01-26	 Dante Abelino Pérez	 Brando Quispe Castañeda

ANEXO N: Certificado de calibración de micropipeta

Edición 00 - Agosto
Página



MSG
SOLUCIONES INTEGRALES

MULTI
SERVICE GROUP

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L.

Certificado de Calibración

LVL19-0054

ORDEN DE TRABAJO	: OT19-0024	<p>El presente Certificado de Calibración evidencia trazabilidad del proceso de calibración con patrones Nacionales o Internacionales, los cuales representan unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).</p> <p>MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. como organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte ejecuta servicios de calibración a la vez que calibra y mantiene sus patrones de referencia con la finalidad de garantizar la trazabilidad de mediciones.</p> <p>Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones, el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.</p> <p>La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición, que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la Guía para la Expresión de la Incertidumbre de la Medición. Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95%.</p> <p>Los resultados reportados son válidos para las condiciones en que se realizó la calibración. Al solicitante corresponde disponer en su momento la recalibración.</p> <p>MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. no se responsabiliza por cualquier daño derivado del uso inadecuado del equipo calibrado, así como de una incorrecta interpretación de los resultados del presente certificado.</p>
CLIENTE	: V. RAVETTINO S.R.L.	
DIRECCIÓN	: CAR. ANTIGUA PANAMERICANA SUR 2000 A.H. NUEVO LURÍN - LURÍN	
LUGAR DE CALIBRACIÓN	: LABORATORIO DE VOLUMEN Y DENSIDAD - MSG	
INSTRUMENTO	: MICROPIPETA	
MARCA	: BRAND	
MODELO	: NO INDICA	
NÚMERO DE SERIE	: NO INDICA	
IDENTIFICACIÓN	: NO INDICA	
CAPACIDAD / ALCANCE	: 100 μ l - 1000 μ l	
DIVISIÓN DE ESCALA	: 1 μ l	
TIPO	: EX	
CLASE DE EXACTITUD	: NO INDICA	
MATERIAL	: POLIESTIRENO	
FECHA DE CALIBRACION	: 2019-01-26	
FECHA DE EMISION	: 2019-01-28	

Sello	Fecha	Director de Laboratorio	Metrólogo a cargo
	 2019-01-28	 Dante W. Abelino Pérez	 Michael Selcedo Aranda

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN DE ESTE DOCUMENTO SALVO AUTORIZACIÓN EXPRESA DE MSG.
 Jr. Las Gravas Nro. 1853 Urb. Flores 78 - Lima 36 Telf: 01 682 4729 / RPC: 992 367 283, 992 019 094
 operaciones@msgperu.com / metrologia@msgperu.com / ventas@msgperu.com / www.msgperu.com

ANEXO O: APROBACIÓN LABORATORIO V. RAVETTINO S.R.L.



CONSTANCIA DE APROBACION

El que suscribe en representación de V. RAVETTINO SRL, con RUC N°20304970660.

Laboratorio Farmacéutico especializado en la fabricación de caramelos duros grado farmacéutico.

AUTORIZA

Que, **Maribel Florencia Minaya Laureano** identificado con DNI N°45948819, ejecute el proyecto de tesis titulada **“IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EMPLEANDO EL SISTEMA DE FILTRACIÓN EZ-FIT™ EN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA PURIFICADA EN LABORATORIO DE CAMELOS FARMACÉUTICOS EN EL PERIODO DE MAYO – OCTUBRE DEL 2019”** en el área de control de calidad.

Se expide la presente documentación, para fines exclusivos de su tesis.

Lurin, 29 de noviembre del 2018


V. RAVETTINO S.R.L.
Victor Sanchez Ventura
DIRECCION TECNICA
C.G.F.P. 15934

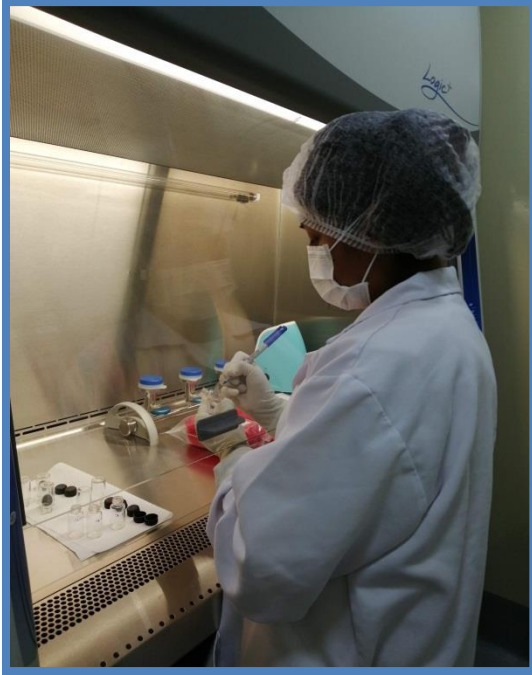
V. Ravettino S.R.L. Carretera Antigua Panamericana Sur N° 2000 - Km 39.5 - Lurín- Lima
Tel. 719 5309 (Of. Administrativa)

ANEXO P: FOTOS

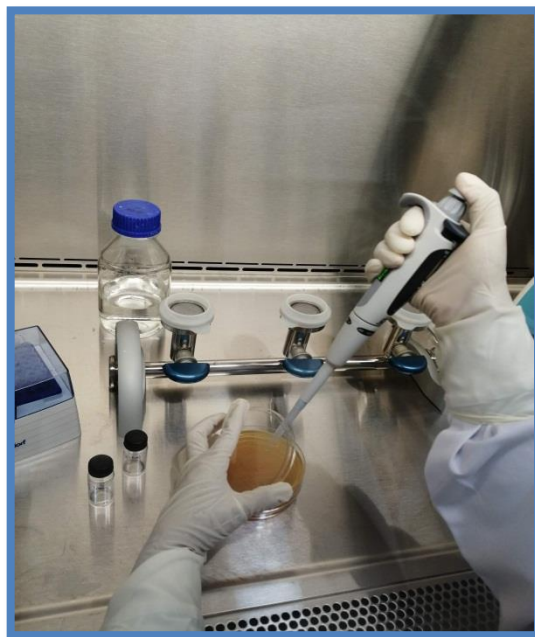
Microorganismos ATCC *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*



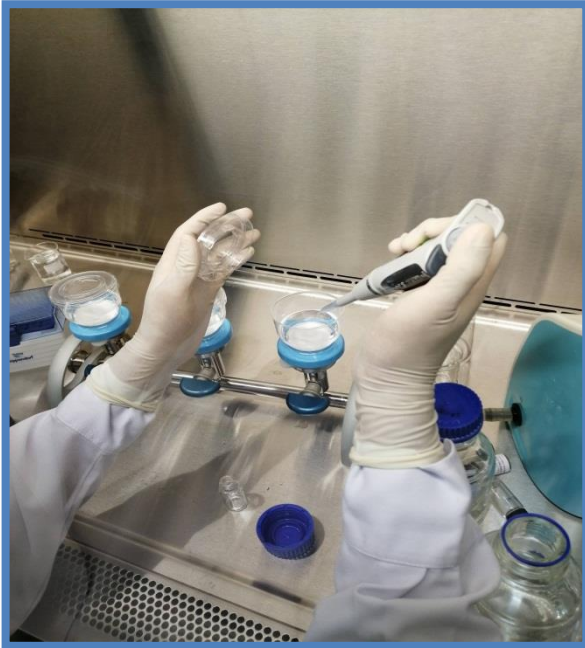
**Preparación de los inóculos de cada uno de los microorganismos ATCC
Pseudomona aeruginosa, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***



**Siembra de las concentraciones de los microorganismos ATCC en el medio
agar TSA**



Siembra de las concentraciones de los microorganismos ATCC en el medio de unidad de filtración



Lectura de las concentraciones de los microorganismos ATCC en la unidad de filtración

