

**CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA
DETERMINAR LA PRESENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS ESPECÍFICAS EN
UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

KARINA ALARCÓN DOMINGUEZ

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA**

2023

**CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA
DETERMINAR LA PRESENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN UN
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

KARINA ALARCÓN DOMINGUEZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito para optar al título de
MICROBIÓLOGO**

Tutor

**FANNY HERRERA ARIAS
Docente, Universidad de Pamplona**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA**

2023

Índice de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GENERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MARCO TEÓRICO.....	16
4.1 MEDIO DE CULTIVO.....	16
4.1.1 Evolución de los medios de cultivos	16
4.1.2 Clasificación de los medios de cultivos	17
4.2 Preparación y esterilización de medios de cultivo	18
4.3 PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD PARA MEDIOS DE CULTIVO.....	18
4.4 Prueba de promoción- productividad de medios de cultivo.....	18
4.5 Prueba de inhibición- selectividad de medios de cultivo.	19
4.6 MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO PARA PRUEBAS DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO E INHIBITORIAS	19
4.6.1 <i>Burkholderia cepacia</i> (BCC)	19
Medio de cultivo <i>Burkholderia cepacia</i>	20
4.6.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
Caldo Fraser. Medio de cultivo liquido de.....	21
Medio de cultivo Palcam.	21
4.6.3 <i>Shigella spp.</i>	21

Medio de cultivo Hektoen.....	22
5. MARCO LEGAL	23
6. METODOLOGÍA	24
6.1 CRITERIOS PARA REALIZAR LA EVALUACIÓN	24
6.2 MATERIALES Y EQUIPOS	24
6.2.1 <i>Microorganismos de prueba</i>	24
6.2.2 <i>Equipos</i>	25
6.2.3 <i>Reactivos y medios de cultivo</i>	26
6.2.4 <i>Materiales</i>	26
6.3 DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTO Y TÉCNICA ANALÍTICA	26
6.3.1 GRUPOS DE PRUEBA.....	26
Grupo viabilidad:	26
Grupo prueba:	27
6.3.2 <i>Recuperación de los microorganismos (Grupo viabilidad)</i>	27
6.3.3 <i>Estandarización del inóculo</i>	27
6.3.4 <i>Prueba de promoción y crecimiento</i>	27
6.3.5 <i>Descripción del montaje de la prueba de promoción de crecimiento y prueba inhibitoria</i>	28
6.3.6 <i>Descripción de los aspectos fisicoquímicos de los medios</i>	29
6.3.7 <i>Evaluación de la vigencia de los medios</i>	30
6.4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	30
6.5 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	31
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS	33

7.1 RESULTADOS PRUEBAS DE PROMOCIÓN E INHIBICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS	35
7.1.1 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	36
7.1.2 RESULTADOS FÍSICOQUÍMICOS	41
9. CONCLUSIONES	44
10. REFERENCIAS	45
11. APÉNDICES	49

Lista de Tablas

Tabla 1. Microorganismos de prueba para realizar las pruebas de vigencia.....	24
Tabla 2. Equipo utilizados en la prueba	25
Tabla 3. Medios de cultivo a validar	26
Tabla 4. Datos de los medios de cultivo para el ensayo.....	33
Tabla 5. Ensayos de viabilidad de las cepas. Tiempo 0	34
Tabla 6. Ensayos de viabilidad de las cepas. Tiempo 15	34
Tabla 7. Ensayos de viabilidad de las cepas. Tiempo 30	35
Tabla 8. Promoción e inhibición Palcam durante el tiempo de vigencia Lote 0432.....	36
Tabla 9. Promoción e inhibición Palcam durante el tiempo de vigencia Lote 0433.....	36
Tabla 10. Promoción e inhibición Palcam durante el tiempo de vigencia Lote 0434....	37
Tabla 11. Promoción e inhibición Hektoen durante el tiempo de vigencia Lote 0429 ..	37
Tabla 12. Promoción e inhibición Hektoen durante el tiempo de vigencia 0430	38
Tabla 13. Promoción e inhibición Hektoen durante el tiempo de vigencia Lote 0431 ..	38
Tabla 14. Promoción e inhibición <i>Burkholderia cepacia</i> durante el tiempo de vigencia Lote 0426.....	39
Tabla 15. Promoción e inhibición <i>Burkholderia cepacia</i> durante el tiempo de vigencia cepacia Lote 0427.....	39
Tabla 16. Promoción e inhibición <i>Burkholderia cepacia</i> durante el tiempo de vigencia Lote 0428.....	40
Tabla 17. Promoción e inhibición Caldo Fraser durante el tiempo de vigencia Lote 0438	40

Tabla 18. Promoción e inhibición caldo Fraser durante el tiempo de vigencia Fraser	
Lote 0439.....	41
Tabla 19. Promoción e inhibición Caldo Fraser durante el tiempo de vigencia Lote 0440	
.....	41
Tabla 20. Aspectos fisicoquímicos para el medio de cultivo Palcam	42
Tabla 21. Aspectos fisicoquímicos para el medio de cultivo Hektoen	42
Tabla 22. Aspectos fisicoquímicos para el medio de cultivo <i>Burkholderia cepacia</i>	42
Tabla 23. Aspectos fisicoquímicos para el medio de cultivo Fraser	42

Lista de Apéndice

APÉNDICE A. GRUPO VIABILIDAD DE LOS INÓCULOS EN LOS DIFERENTES TIEMPOS EVALUADOS.	49
APÉNDICE B. PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO Y PRUEBA INHIBITORIA	51

Resumen

El control de calidad de medios de cultivos implica una serie de pruebas y evaluaciones realizadas con el fin de garantizar la eficacia de los medios de cultivos utilizados en los laboratorios de microbiología; esto incluye, entre otras cosas, determinar su productividad y selectividad, evaluar sus propiedades fisicoquímicas, verificar su esterilidad. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la calidad de los medios de cultivo Palcam, Hektoen, agar Burkholderia cepacia y caldo Fraser durante 30 días en el Laboratorio Laser Farmacéutica S.A.S. Dentro de los resultados obtenidos, la productividad de los medios de cultivos sólidos fue mayor al 90% , se comprobó la selectividad de los mismos al no permitir el crecimiento de cepas indeseadas; para la promoción del caldo Fraser se observó visiblemente el cambio de color a negro al inocular 100 UFC/mL del microorganismo diana y la inhibición de la cepa indeseada; todos los medios de cultivo cumplieron los estándares de calidad en los 3 tiempos analizados (0 días, 15 días y 30 días), por ello, se estableció que el tiempo de vigencia de los medios de cultivo estudiados fue de 30 días estando almacenados en refrigeración a temperatura de 2°C a 8°C.

Palabras clave: Burkholderia, Fraser, Hektoen, Palcam, productividad, selectividad.

Abstract

The quality control of culture media involves a series of tests and evaluations carried out in order to guarantee the efficacy of the culture media used in microbiology laboratories; this includes, among other things, determining its productivity and selectivity, evaluating its physicochemical properties, verifying its sterility. The objective of this study was to evaluate the quality of the culture media Palcam, Hektoen, *Burkholderia cepacia* agar and Fraser broth for 30 days at the Laser Pharmaceutical S.A.S. Laboratory. Within the results obtained, the productivity of the solid culture media was greater than 90%, their selectivity was verified by not allowing the growth of unwanted strains; for the promotion of Fraser broth, the color change to black was visibly observed when inoculating 100 CFU/mL of the target microorganism and the inhibition of the unwanted strain; all the culture media met the quality standards in the 3 times analyzed (0 days, 15 days and 30 days), therefore, it was established that the validity time of the culture media studied was 30 days when stored in refrigeration. at a temperature of 2°C to 8°C.

Keywords: *Burkholderia*, Fraser, Hektoen, Palcam, productividad, selectividad

Glosario

Cepa de referencia: Es una muestra de un microorganismo que se utiliza en estudios científicos, se encuentra caracterizada como mínimo a nivel de género y especie y es seleccionada por ser representativa y se obtiene de colecciones reconocidas.

Control de calidad: Es un conjunto de técnicas, metodologías y herramientas utilizadas para garantizar que un producto o servicio cumpla con los requisitos y expectativas del cliente y sea de la más alta calidad posible. Se utiliza para fabricar mejor el producto, con los mejores componentes y materias primas y aplicando los controles adecuados.

Comparabilidad: Es el crecimiento de microorganismos que es visiblemente comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente.

Estandarización: La estandarización microbiana es el proceso de hacer que las soluciones o los medios de cultivo tengan una cantidad específica de microorganismos asegurando que se estén utilizando cantidades precisas y reproducibles de microorganismos.

Esterilización: Es el proceso que se lleva a cabo para asegurar la eliminación o muerte de todos los microorganismos presente en un determinado material o producto.

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado de una medición (valor medio) y el valor de referencia aceptado (patrón de uso interno o patrón internacional).

Inóculo: Se refiere a la cantidad de microorganismos que se añaden a un medio de cultivo para iniciar el crecimiento bacteriano.

Promoción de crecimiento: Se refiere al conjunto de condiciones y procesos que se utilizan para favorecer el desarrollo de microorganismos deseados comparable al obtenido anteriormente con un medio analizado y aprobado previamente.

Productividad: Referente a los medios de cultivos, es la capacidad que tiene este para favorecer el crecimiento y la reproducción de un microorganismo.

Recuperación microbiana: Se refiere a la proporción de microorganismos que pueden ser recuperados o detectados en una muestra después de ser procesada y analizada en un procedimiento.

Repetibilidad: Variable estadística que determina si los resultados de un experimento o prueba son consistentes y reproducibles bajo las mismas condiciones cada vez que se lleva a cabo.

Selectividad: Es la propiedad que tiene un medio de cultivo para suprimir el crecimiento de un microorganismo interferente.

Validación: Acción de probar y documentar que cualquier proceso, procedimiento o método, conduce efectiva y consistentemente a los resultados esperados.

Verificación: Es un proceso de confirmación o comprobación de la exactitud, autenticidad o validez de algo.

Viabilidad: Capacidad o posibilidad de que algo pueda llevarse a cabo de manera efectiva y logrando los objetivos deseados.

Vigencia: Estado de lo que tiene validez durante un periodo de tiempo determinado.

1. Introducción

Los medios de cultivo son esenciales para el trabajo de laboratorio en la gran mayoría de los campos de acción de la microbiología y por esa razón su control de calidad es un proceso fundamental; este proceso incluye una serie de actividades, que van desde la elección del o los microorganismos específicos, la selección del medio de cultivo apropiado, la preparación y esterilización del medio de cultivo y la verificación de la esterilidad del medio de cultivo.

La verificación es el proceso documentado por el cual un procedimiento analítico (o método) validado demuestra ser adecuado para el uso al que está destinado; los métodos farmacopeicos se consideran métodos validados (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013). La evaluación del control de calidad de los medios de cultivo es un proceso necesario en microbiología ya que garantiza que los microorganismos estén creciendo en condiciones óptimas, asegurando la integridad de los datos generados en los laboratorios, lo que a su vez respalda la confiabilidad de los resultados obtenidos como también permitir la estandarización de los procesos, lo que facilita la comparación y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

La implementación de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) son fundamentales para garantizar la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos en los laboratorios de investigación y desarrollo. En Colombia, la resolución 3619 del 2013 Ministerio de Salud y Protección Social establece los requisitos para implementar las BPL en los laboratorios que realicen control de calidad en productos farmacéuticos implicando, entre otros aspectos, evaluar el control de calidad de los medios de cultivo (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).

2. Justificación

La evaluación del control de calidad de los medios de cultivo empleados en el laboratorio de microbiología garantiza que los microorganismos están creciendo en condiciones óptimas contribuyendo a asegurar la fiabilidad y veracidad de los resultados obtenidos.

Para el caso de análisis microbiológicos para productos farmacéuticos, los medios de cultivo deben cumplir con los requisitos establecidos por las Farmacopeas aprobadas en la legislación colombiana como puede ser la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), que implican verificar su preparación realizando pruebas de productividad de cepas deseadas (promoción de crecimiento) e inhibición de cepas indeseadas, por cada lote y cada preparación de medios de cultivo, además de poder establecer el tiempo de vigencia del medio después que es preparado; asegurando, de esta forma, la calidad de cada medio preparado.

En este trabajo se realizó la evaluación del control de calidad de los medios de cultivo Palcam, Hektoen, agar *Burkholderia cepacia* y caldo Fraser durante 30 días en el Laboratorio **Laser Farmacéutica S.A.S.**

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Realizar el control de calidad de medios de cultivo selectivos y diferenciales utilizados en un laboratorio de microbiología para determinar bacterias patógenas.

3.2 Objetivos Específicos

- Establecer la productividad/promoción de los medios de cultivo mediante la inoculación de cepas deseadas (diana) en cada medio ensayado.
- Determinar la selectividad de los medios de cultivo inoculando las cepas bacterianas interferentes/inhedoras respectivas.
- Determinar la estabilidad de los medios de cultivo en condiciones de refrigeración con el fin de favorecer el crecimiento de los microorganismos.

4. Marco Teórico

4.1 Medio de Cultivo

Un medio de cultivo es una mezcla equilibrada de nutrientes necesarios para la recuperación, proliferación, aislamiento y diferenciación de microorganismos en las condiciones adecuadas de temperatura y pH (Cerra et al., 2013); por ello, los laboratorios deben tener un control en el diseño, almacenamiento, preparación y uso de los medios de cultivos para asegurar la validez y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Rodríguez et al. (2018) establecen que los componentes de un medio de cultivo “pueden ser de origen orgánico o inorgánico, natural o artificial, su finalidad es garantizar el crecimiento del organismo o célula, su identificación o diferenciación dentro de un conjunto de ellos e, incluso, inhibir el desarrollo de otros”.

Entre los principales componentes de un medio de cultivo se tiene: Agua, carbohidratos, sales minerales (orgánicas e inorgánicas), colorantes e indicadores, factores de crecimiento y otros como antibióticos (Rodríguez et al., 2018).

Un medio de cultivo debe reunir una serie de condiciones para que el crecimiento de las bacterias sea el óptimo, como son: Disponibilidad de nutrientes, como mínimo ha de contar con fuente de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas; consistencia, presión de oxígeno u otros gases, contenido de humedad, pH y temperatura de almacenamiento adecuados y esterilidad (Cerra et al., 2013).

4.1.1 Evolución de los medios de cultivos

En su evolución, la microbiología inició desarrollándose en el instante en que fue descubierto el microscopio, tras este hecho se desarrolló el uso de agar y más adelante de los

medios de cultivo, lo que contribuyó de manera relevante en el desarrollo de la microbiología; pioneros como Brefeld, quien logró aislar y cultivar esporas de hongos en medios sólidos hechos a partir de gelatina y Lister quien desarrolló un medio de cultivo puro basado en diluciones de medios líquidos; Koch por su parte utilizó rodajas de papa y gelatina como fuente nutritiva obteniendo un medio sólido transparente facilitando la observación detallada de las colonias microbianas; en 1887, Petri fue el primero en utilizar las placas de vidrio planas, por su parte Beijerinck y Winogradsky, aportaron las bases para el desarrollo de medios selectivos lo que fue continuado por Wurtz quien fue el primero en adicionar indicadores de pH a la composición de los medios, siendo el comienzo de los medios diferenciales (Casado et al., 2012, pp 7-8).

4.1.2 Clasificación de los medios de cultivos

De acuerdo con el Manual de Microbiología de Merck (sf, 12th edición, pp.143), según su consistencia pueden ser:

- Medio líquido: consta de una solución acuosa de uno o más constituyentes.
- Medios sólidos: contiene un agente gelificante o solidificante en concentraciones que varían del 1 al 2%.
- Medios semisólidos: se preparan a partir de medios líquidos añadiéndoles un agente solidificante en una proporción menor que la preparación de medios sólidos.

De acuerdo con intención de uso, los principales pueden ser:

- Medio de conservación: mantiene la viabilidad de los microorganismos durante un período prolongado.
- Medio de enriquecimiento: proporciona los nutrientes requeridos para la multiplicación de los microorganismos.

- Medio de enriquecimiento selectivo: formulado para apoyar la multiplicación del microorganismo objetivo o un grupo de microorganismos mientras se inhibe parcial o totalmente el crecimiento de los organismos que interfieren acompañantes.
- Medio diferencial: permite la detección de una o más características fisiológicas/bioquímicas de un microorganismo para su identificación (Merck sf, 12th edición, p.143).

4.2 Preparación y esterilización de medios de cultivo

Los medios de cultivo se pueden encontrar comercialmente listos para su uso o prepararse en el laboratorio; la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) capítulo 1117 (2022) destaca:

Se debe garantizar cada una de las etapas de su obtención que van desde su preparación, lavado del material de vidrio, almacenamiento y las pruebas de control de calidad al medio preparado; implicando, entre otras cosas, seguir cada una de las instrucciones de preparación del fabricante del medio, validar el ciclo de esterilización, realizar las pruebas de esterilidad del medio de cultivo y de promoción del crecimiento al medio de cultivo obtenido (USP 1117, 2022).

4.3 Pruebas de control de calidad para medios de cultivo

A todos los medios de cultivo que se preparen se debe realizar pruebas de control de calidad, que incluyen: toma de pH, promoción de crecimiento/ inhibición y la verificación de estabilidad periódica para confirmar la fecha de vencimiento (USP 1117, 2022).

4.4 Prueba de promoción- productividad de medios de cultivo.

El objetivo de esta prueba es determinar si el medio de cultivo fomenta el crecimiento de los microorganismos deseados. Un resultado favorable se obtiene cuando el crecimiento del

microorganismo deseado es comparable al crecimiento obtenido con un medio control ensayado previamente; el crecimiento obtenido de la cepa deseada no debe ser inferior a 50% con relación al inóculo control (USP 61, 2022).

4.5 Prueba de inhibición- selectividad de medios de cultivo.

Determina la capacidad de un medio de cultivo selectivo para inhibir el crecimiento de un microorganismo no deseado. No debe crecer la cepa indeseada (inhibitoria) al inocular 100 ufc/mL (USP 62, 2022).

4.6 Microorganismos y medios de cultivo para pruebas de promoción de crecimiento e inhibitorias

4.6.1 *Burkholderia cepacia* (BCC)

Los microorganismos del complejo *BCC* son “bacilos rectos, Gram negativos no fermentador de glucosa, oxidasa positiva y catalasa negativa, no presenta esporas, es aerobio estricto, con un flagelo polar que le permite movilidad; su tamaño varía entre 1 a 5 µm de longitud y 0,5 a 1,0 µm de ancho” (Mahenthiralingam et al., 2008). El complejo *Burkholderia cepacia* se encuentra conformado por 22 especies: *B. alpina*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. arbris*, *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. difusa*, *B. dolosa*, *B. dolosa*, *B. lata*, *B. latens*, *B. metallica*, *B. multivorans*, *B. paludis*, *B. pseudomultivorans*, *B. pyrrocinia*, *b. seminalis*, *B. stabilis*, *B. stagnalis*, *B. territorio*, *B. ubonensis* y *B. vietnamiensis* (Rojas et al., 2019).

Los miembros del *BCC* son bacterias oportunistas que pueden causar infecciones graves en pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos, los síntomas varían según la infección pueden incluir fiebre, escalofríos, tos, expectoración con sangre y dificultad para respirar; en situaciones graves, la infección puede provocar sepsis, una infección generalizada y potencialmente mortal (Rojas et al., 2019).

La FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) ha emitido varias alertas sanitarias sobre productos contaminados con esta bacteria, dentro de ellos han identificado productos farmacéuticos no estériles a base de agua, tales como solución oral de docusato (laxante), povidona yodada, cloruro de benzalconio y gluconato de clorhexidina, en los Estados Unidos y en el extranjero (FDA, 2023).

Por todo lo anterior, la FDA “advierte a los fabricantes de medicamentos que el complejo *Burkholderia cepacia* presenta un riesgo de contaminación en productos farmacéuticos no estériles a base de agua” (FDA, 2023).

Medio de cultivo *Burkholderia cepacia* (BCSA). Dentro de los componentes de este medio de cultivo se encuentra la lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, extracto de levadura, rojo de fenol, cristal violeta; la polimixina B, gentamicina y vancomicina le confieren la selectividad al medio; el crecimiento típico de las bacterias del complejo *B. cepacia* son colonias de color marrón verdoso con halo amarillo o colonias blancas con halo rosado-rojo (USP 60, 2019).

4.6.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva, un bacilo corto no esporulado, y móvil, gracias a la presencia de flagelos polares, catalasa positiva y oxidasa negativa; tiene la capacidad de crecer y multiplicarse en una amplia variedad de condiciones ambientales, incluyendo temperaturas bajas y altas de hasta 45°C, pH ácidos y salinidad elevada (Díaz, 2005).

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena que puede causar enfermedades graves en humanos, especialmente en personas con sistemas inmunológicos debilitados, ancianos, mujeres embarazadas y recién nacidos; puede causar meningitis, sepsis, encefalitis y otros

trastornos neurológicos, así como abortos espontáneos y partos prematuros en embarazadas (Beamonte et al., 2020).

Caldo Fraser. Medio de cultivo líquido de enriquecimiento selectivo para *Listeria* spp.

“Su mecanismo de acción para inhibir la microbiota acompañante se da gracias al cloruro de litio, el ácido nalidíxico y el clorhidrato de acriflavina; la detección de la actividad β -D-glucosidasa es posible con la adición de esculina y citrato de amonio y hierro (III), la glucosa esculina es escindida por β -D-glucosidasa en esculetina y glucosa; la esculetina luego forma un complejo de color verde oliva a negro con los iones de hierro (III), por lo tanto el crecimiento de *Listeria* normalmente provoca un ennegrecimiento del caldo” (Merck sf, 12th edición, p. 294).

Medio de cultivo Palcam. “Medio de cultivo sólido, selectivo y diferencial para la detección y aislamiento de *Listeria monocytogenes*; la selectividad del medio se obtiene por el contenido en polimixina, acriflavina, ceftazidima y cloruro de litio; *L. monocytogenes* degrada la esculina del medio a esculetina formando un complejo de color verde a negro por la acción de los iones de hierro tiñendo así las colonias de *L. monocytogenes* de color verde grisáceo con un halo negro” (Merck sf, 12th edición, p. 383).

4.6.3 *Shigella* spp.

Shigella spp. es una bacteria Gram negativa de tamaño de 1-6 μm de longitud x 0.3-1 μm de diámetro, anaerobios facultativos, no móviles, no formadoras de esporas, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, generalmente fermentan la glucosa sin producir gas, no

descarboxilan la lisina, no fermentan lactosa y no producen sulfuro de hidrógeno y carecen de actividad ureasa. Se han identificado 50 serotipos, pertenecientes a cuatro serogrupos (o especies): grupo A (*S. dysenteriae*), grupo B (*S. flexneri*), grupo C (*S. boydii*), y grupo D (*S. sonnei*); las especies de *Shigella* causan infecciones agudas del tracto gastrointestinal, a veces con manifestaciones extraintestinales (Villacrés, 2015).

Medio de cultivo Hektoen. “Es un medio de cultivo que permite la detección de microorganismos Gram negativos de especies de *Salmonella* y *Shigella*. Se caracteriza por ser un medio selectivo gracias a las sales biliares que inhibe la biota acompañante y diferencial por el citrato férrico amónico, tiosulfato sódico, la lactosa, la sacarosa, la salicina y el indicador azul de bromotimol junto a la fucsina ácida, mientras que el citrato de hierro es el indicador de la formación de SH_2 ; *Shigella* spp. al no fermentar la lactosa y al no producir SH_2 las colonias características son del mismo color del medio, verde-azuladas mientras que *Salmonella* spp. en presencia de tiosulfato es capaz de producir SH_2 resultando en colonias grandes de color negro” (Merck, sf, 12th edición, pp 304).

5. Marco Legal

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 1160 del 2016. Por la cual se establece el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura y las Guías de Inspección de Laboratorios o Establecimientos de Producción de medicamentos.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 3619 del 2013. Por la cual se expide el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos.

Organización Internacional de Normalización 11290-1 (ISO, 2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.

Organización Internacional de Normalización 21567 (ISO, 2004). Microbiology off food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Shigella* spp.

United States Pharmacopeia USP-NF CAPITULO 1117. Buenas Prácticas de las Laboratorio Microbiológico.

United States Pharmacopeia USP-NF CAPITULO 60. Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas para el complejo *Burkholderia cepacia*.

United States Pharmacopeia USP-NF CAPITULO 61. Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de recuento microbiano.

United States Pharmacopeia USP-NF CAPITULO 62. Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de microorganismos específicos.

6. Metodología

6.1 Criterios para realizar la evaluación

Los protocolos se realizaron teniendo en cuenta la normatividad vigente de la USP capítulo <60>, <61>, <62>, <1117> y las normas ISO 11290-1 e ISO 21567, descritas en el marco legal.

Nota aclaratoria: Para el caso de los medios de cultivo Fraser, Palcam y Hektoen (no incluidos en las farmacopeas oficiales) se usó el protocolo ISO respectivo para su detección en alimentos, por solicitud del laboratorio donde se realizaron los ensayos.

6.2 Materiales y equipos

6.2.1 Microorganismos de prueba

A continuación, se nombran los microorganismos utilizados como estándares de referencia para las pruebas (tabla 1), los equipos utilizados (tabla 2) y los medios de cultivos para las pruebas (tabla 3) que se realizaron por el **Laboratorio Laser Farmacéutica S.A.S.**

Tabla 1. Microorganismos de prueba para realizar las pruebas

Microorganismo	ATCC®
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
<i>Escherichia coli</i>	8739
<i>Salmonella Typhimurium</i>	14028
<i>Listeria monocytogenes</i>	35152
<i>Shigella flexneri</i>	12022
<i>Burkholderia cepacia</i>	25416
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	BAA-245

Nota. Datos tomados de la USP <60>, <61>, <62>, ISO 11290-1 e ISO 21567

6.2.2 Equipos

Tabla 2. Equipos utilizados durante la prueba de control de calidad para medios de cultivo

Equipo	Características
Espectrofotómetro	Fabricante: Lab Science
	Modelo-serie: VEH1406116
Autoclave para medios de cultivo	Fabricante: Tuttnauer
	Modelo-serie: Modelo 387 OE
Potenciómetro	Fabricante: OHAUS
	Modelo-serie: B527139251
Incubadora bacterias	Fabricante: MEMMERT
	Modelo-serie: D416.0372
Micropipeta 10-100µL	Fabricante: BOECO
	Modelo-serie: 01N31406
Termómetro Infrarrojo	Fabricante: UNI-T
	Modelo-serie: UT300C
Micropipeta 100-1000µL	Fabricante: Cleaver Scientific
	Modelo-serie: 2565600034
Cabina de Flujo Laminar	Fabricante: NUAIRE
	Modelo-serie: 98007
Autoclave para medios de cultivo	Fabricante: Raypa
	Modelo-serie: A HS-75N
Micropipeta 1-10 mL	Fabricante: BRAND
	Modelo-serie: 20C36830
Vórtex	Fabricante: BOECO
	Modelo-serie: V-1 PLUS

Nota. Equipos de Laboratorio Laser Farmacéutica S.A.S

6.2.3 Reactivos y medios de cultivo

Tabla 3. Medios de cultivo a validar

Medio de cultivo
Caldo Fraser
Medio de cultivo Palcam
Medio de cultivo Hektoen
Medio de cultivo <i>Burkholderia cepacia</i>

Nota. En el informe quedaran consignados todos los lotes y fechas de vencimiento de las cepas, medios de cultivo y reactivos utilizados.

6.2.4 Materiales

- Asa microbiológica
- Cajas de Petri estériles de 90 mm
- Cajas de Petri estériles de 45 mm
- Frascos Schott de 100 mL
- Gradillas
- Puntas para micropipeta de 100µL, 1000µL y 10 mL
- Tubos 16x150 mm vacíos estériles.

6.3 Descripción de procedimiento y técnica analítica

6.3.1 Grupos de prueba

Grupo viabilidad: Son los inóculos de los microorganismos *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia cenocepacia*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, estos se encuentran en una suspensión de agua peptonada a una concentración de ≤ 100 UFC/mL y

de los cuales se evaluó el crecimiento bacteriano en medio de cultivo Agar Triptona-Soja (TSA) (se realizaron 2 réplicas).

Grupo prueba: En donde se inoculó el medio de cultivo a evaluar con el microorganismo de ensayo (≤ 100 UFC/mL).

6.3.2 Recuperación de los microorganismos (Grupo viabilidad)

Del Cryobank conservado a -20°C , se tomó una perla de cada una de las cepas requeridas y se pasaron a una caja de medio TSA para bacterias. Se incubó de 18 a 24 horas a $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$.

6.3.3 Estandarización del inóculo

Luego del tiempo de incubación del microorganismo recuperado se tomó una asada y se procedió a disponer en agua peptonada 0.1%. Se preparó según el tubo de 0.5 de la escala de McFarland, usando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. Se ajustó el inóculo de cada microorganismo para que la dilución de trabajo corresponda a un inóculo de ≤ 100 UFC/mL. De este inóculo se realizaron los controles positivos para todas las pruebas (se realizaron 2 réplicas).

6.3.4 Prueba de promoción y crecimiento

A los medios de cultivo se les realizó la prueba de promoción y crecimiento y la prueba inhibitoria a 3 tiempos (tiempo 0, tiempo 15 días y tiempo 30 días) para garantizar la vigencia de estos y en las condiciones de almacenamiento definidas.

6.3.5 Descripción del montaje de la prueba de promoción de crecimiento y prueba inhibitoria

Ítem	Procedimiento
1.	Se preparó el inóculo como se describe en la estandarización. Se procedió a hacer diluciones seriadas base 10 a partir del inóculo madre a una concentración de 10^8, de esta suspensión se tomaron 1ml y se adicionó a tubos con 10ml de agua peptonada 0.1% y así sucesivamente se llevaron a cabo las demás diluciones hasta llegar a una concentración 10^2 para obtener ≤ 100 UFC/mL.
2.	Para la prueba de promoción de crecimiento y prueba inhibitoria se procedió de la siguiente manera: Caldo Fraser: Incubando el caldo por 24 horas a 37°C. Microorganismo Diana: <i>Listeria monocytogenes</i> Microorganismo interferente : <i>Escherichia coli</i> Medio de Cultivo Palcam: Incubando el medio de cultivo por 24 horas a 37°C. Microorganismo Diana: <i>Listeria monocytogenes</i> Microorganismo interferente : <i>Escherichia coli</i> Medio de Cultivo Hektoen: Incubando el medio de cultivo por 20-24 horas a 37°C. Microorganismo Diana: <i>Salmonella Typhimurium</i>, <i>Shigella flexneri</i> Microorganismo interferente : <i>Escherichia coli</i> Medio de Cultivo Burkholderia cepacia: Incubando el medio de cultivo por 48-72 horas a 30-35°C. Microorganismo Diana : <i>Burkholderia cepacia</i> y <i>Burkholderia cenocepacia</i>. Microorganismo interferente : <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

3.

Se tomó el inóculo preparado del ítem 1 y se procedió de la siguiente manera:

Para medios de cultivos líquidos: Se agregó 0.1 mL del inóculo del microorganismo de prueba (a una concentración de 1×10^4 UFC/mL, para que la concentración de este quedara ≤ 100 UFC/mL) a 10 mL del caldo a evaluar. La incubación se hizo de acuerdo con lo descrito en el ítem 2.

Para medios de cultivo sólido: Para el recuento por profundidad se inoculó 1 mL del microorganismo de prueba a una concentración ≤ 100 UFC/mL en cajas Petri por duplicado y se agregó 15-20 mL del medio de cultivo a una temperatura $<45^\circ\text{C}$. Para el recuento por superficie se inoculó 0.1 mL del microorganismo de prueba a una concentración de 1×10^3 UFC/mL, para que la concentración de este quedara ≤ 100 UFC/mL y se inoculó de forma homogénea en toda la superficie del medio de cultivo sólido con un asa de Hockey. Se incubó de acuerdo con lo descrito en el ítem 2.

Nota: los análisis se realizaron por duplicado tanto para los microorganismos dianas como para los microorganismos interferentes.

4.

Pasado el tiempo de incubación se registraron los datos.

6.3.6 Descripción de los aspectos fisicoquímicos de los medios

Ítem	Procedimiento
1.	Paralelo al análisis de la prueba de promoción de crecimiento y prueba inhibitoria se anotaron los siguientes parámetros: -pH: Se confirmó el pH para cada lote del medio con un medidor de pH, haciendo uso de un potenciómetro después de haber sido calibrado adecuadamente con buffers de pH (USP 61, 2022).

-Color: Para los medios preparados se observaron si estos al pasar el tiempo estando almacenados originaron algún cambio de color o mantuvieron el mismo color desde su preparación (USP 61, 2022).

- Temperatura de almacenamiento: Se hizo monitoreo de la temperatura de la nevera en donde fueron almacenados y conservados los medios de cultivos para los tres tiempos de análisis (USP 61, 2022).

6.3.7 Evaluación de la vigencia de los medios

Ítem	Procedimiento
1.	Para determinar la vigencia de los medios de cultivo, se evaluaron los aspectos fisicoquímicos de los medios descrito anteriormente para la prueba de promoción y crecimiento y la prueba inhibitoria en diferentes tiempos. Tiempo 0 tras la preparación. 15 días tras la preparación. 30 días tras la preparación.
2.	Se registraron los datos en los diferentes tiempos evaluados.

6.4. Parámetros estadísticos

Parámetro	Cálculo
Exactitud (Porcentaje de recuperación)	Este se obtiene teniendo en cuenta UFC teórico (inóculo) vs el UFC experimental.
La cantidad de microorganismos recuperados en el medio de cultivo a evaluar con	$\% \text{ Recuperación} = \frac{UFC \text{ Experimental}}{UFC \text{ Inóculo}} \times 100$

respecto al control del inóculo estandarizado, expresado en porcentaje.

Comparabilidad del medio

Comparar los resultados cuantitativos de cultivo anterior con el medio de cultivo que con un lote de medio de cultivo igual se está evaluando. previamente aprobado.

Se toman los datos obtenidos del medio

de cultivo anterior con el medio de cultivo que se está evaluando.

$$\text{Comparabilidad} = \frac{\text{UFC del medio evaluado}}{\text{UFC del medio previamente aprobado}}$$

Promoción para medios líquidos (caldos)

Se determina con la turbidez o ennegrecimiento del medio

Se evidencia con la turbidez del medio pasado el tiempo de incubación.

Se compararon los resultados con un lote de medio de cultivo igual previamente aprobado

6.5 Criterios de aceptación

Parámetro	Criterio de aceptación
Exactitud (Porcentaje de recuperación)	$\geq 50\%$ y $\leq 200\%$
Comparabilidad del medio	≥ 0.5
Promoción para medios líquidos (caldos)	0= ausencia de turbidez, 1=parcialmente turbio, 2=turbio O Ennegrecimiento del medio (Positivo o negativo)

8. Resultados y análisis

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de la verificación del control de medios de cultivo según las pruebas realizadas. En la tabla 4, se describen los medios de cultivos tomados para el ensayo con sus respectivos lotes de preparación y de esterilización.

Tabla 4. Datos de los medios de cultivo para el ensayo

Medio de cultivo	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	LP	LE	LP	LE	LP	LE
Caldo Fraser	0438	134	0439	134	0440	134
Medio de cultivo Palcam	0432	134	0433	134	0434	134
Medio de cultivo Hektoen	0429	134	0430	134	0431	134
Medio de cultivo <i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i>	0426	134	0427	134	0428	134

Nota. LP: Lote de preparación. LE: Lote de esterilización.

Seguidamente, se observa la recuperación de cada una de las cepas bacterianas (tablas 5, 6 y 7) para determinar su viabilidad en medio de cultivo TSA luego de ser incubados a 32.5°C durante 18 a 24 horas en los 3 tiempos evaluados, además de las absorbancias y el porcentaje de recuperación; se puede apreciar que las cepas tuvieron un crecimiento satisfactorio y acorde a las UFC que se esperaban obtener según la USP 61 (menos de 100 UFC), ya que cada una de las suspensiones de los inóculos de las cepas de referencia estandarizadas contenía ≤ 100 UFC (USP 61, 2022).

Tabla 5. Ensayos de viabilidad de las cepas. Tiempo 0 días

Microorganismo	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	UFC ml teórico	Recuento 1	Recuento 2	Promedio recuento	% de recuperación
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.069	0.069	0.069	0.069	74	91	85	88	118%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.071	0.071	0.071	0.071	77	95	91	93	120%
<i>Escherichia coli</i>	0.072	0.072	0.072	0.072	79	81	89	85	107%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.073	0.073	0.073	0.073	80	94	86	90	112%
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	0.072	0.072	0.072	0.072	79	99	97	98	124%
<i>Burkholderia cepacia</i>	0.073	0.073	0.073	0.073	80	90	92	91	113%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.070	0.070	0.070	0.070	76	91	97	94	123%
<i>Shigella flexneri</i>	0.071	0.071	0.071	0.071	77	79	83	81	105%

Nota. ABS: Absorbancias tomadas. El UFC Teórico es obtenido a partir de una matriz estadística interna del Laboratorio Laserpharmaceutica dependiente de las absorbancias (Estos valores de UFC Teórico lo obtiene el analista de validaciones encargado de la matriz estadística).

Tabla 6. Ensayos de viabilidad de las cepas. Tiempo 15 días

Microorganismo	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	UFC ml teórico	Recuento 1	Recuento 2	Promedio recuento	% de recuperación
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.068	0.068	0.068	0.068	73	96	94	95	130%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.069	0.069	0.069	0.069	74	98	96	97	131%
<i>Escherichia coli</i>	0.077	0.077	0.077	0.077	86	93	95	94	156%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.072	0.072	0.072	0.072	79	96	98	97	122%
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	0.071	0.071	0.071	0.071	77	95	97	96	124%
<i>Burkholderia cepacia</i>	0.073	0.073	0.073	0.073	80	97	99	98	122%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.073	0.073	0.073	0.073	80	98	94	96	120%
<i>Shigella flexneri</i>	0.081	0.081	0.081	0.081	92	89	93	91	98%

Nota 1. ABS: Absorbancias tomadas. El UFC Teórico es obtenido a partir de una matriz estadística interna del Laboratorio Laserpharmaceutica dependiente de las absorbancias. (Estos valores de UFC Teórico lo obtiene el analista de validaciones encargado de la matriz estadística).

Tabla 7. Ensayos de viabilidad de las cepas. Tiempo 30 días

Microorganismo	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	UFC ml teórico	Recuento 1	Recuento 2	Promedio recuento	% de recuperación
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.075	0.075	0.075	0.075	83	99	97	98	118%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.074	0.074	0.074	0.074	82	99	91	95	115%
<i>Escherichia coli</i>	0.082	0.082	0.082	0.082	94	88	90	89	95%
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.076	0.076	0.076	0.076	85	93	99	96	113%
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	0.085	0.085	0.085	0.085	98	102	96	99	101%
<i>Burkholderia cepacia</i>	0.083	0.083	0.083	0.083	95	85	93	89	94%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.070	0.070	0.070	0.070	76	97	93	95	125%
<i>Shigella flexneri</i>	0.081	0.081	0.081	0.081	92	88	90	89	97%

Nota 2. ABS: Absorbancias tomadas. El UFC Teórico es obtenido a partir de una matriz estadística interna del Laboratorio Laserpharmaceutica dependiente de las Absorbancias. (Estos valores de UFC Teórico lo obtiene el analista de validaciones encargado de la matriz estadística).

7.1 Resultados pruebas de promoción e inhibición de los medios de cultivos

En general, para los medios de cultivos sólidos selectivos utilizados, los resultados mostrados en las tablas 8 a 16 (apéndice A), comprueban su productividad con los microorganismos diana y su selectividad al inhibir el crecimiento de los microorganismos interferentes con cada uno de los tres lotes evaluados. Adicionalmente, como se observa en las tablas, el porcentaje de recuperación respecto al inóculo estandarizado cumple los criterios de aceptación que debe ser $\geq 50\%$ (USP 61, 2022).

7.1.1 Resultados microbiológicos

Específicamente en el medio de cultivo Palcam, se observó la inhibición del microorganismo interferente y la promoción del microorganismo diana (tabla 8, 9 y 10), teniendo resultados no menores al 50% (USP 61, 2022); *L. monocytogenes* hidroliza la esculina a esculetina, reaccionando con el citrato férrico el cual produce un precipitado negro produciendo colonias grisáceas con halo negro (Apéndice B); en este medio la selectividad la suministran el cloruro de litio, la acriflavina y la cefotaxima que reprime el crecimiento de Gram negativas y las Gram positivas acompañantes (Merck sf, 12th edición, p. 383). Con relación a los diferentes lotes y los tres tiempos evaluados, la recuperación de *L. monocytogenes* se mantuvo mayor a un 121%, por lo tanto, se puede afirmar, que el tiempo de almacenamiento del medio de cultivo no afectó su productividad ni selectividad y que pueden ser usados hasta 30 días luego de ser preparados.

Tabla 8. Promoción e inhibición Palcam durante el tiempo de vigencia Lote 0432

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <i>Palcam</i>			Lote: 0432						
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	96	94	95	97	99	98	95	99	97
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad	
<i>L. monocytogenes</i>	125%	N/A		122%	1.0		128%	0.9	

Nota. R: Recuento. N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Tabla 9. Promoción e inhibición Palcam durante el tiempo de vigencia Lote 0433

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <i>Palcam</i>					Lote: 0433				
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	94	95	94	96	98	97	96	94	95
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		

	% de recuperación	Comparabilidad	% de recuperación	Comparabilidad	% de recuperación	Comparabilidad
<i>L. monocytogenes</i>	123%	N/A	121%	1.0	125%	0.9

Nota. R: Recuento N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Tabla 10. Promoción e inhibición Palcam durante el tiempo de vigencia Lote 0434

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <u>Palcam</u>						Lote: 0434			
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	96	94	95	97	99	98	97	95	96
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad	
<i>L. monocytogenes</i>	125%	N/A		122%	1.0		126%	0.9	

Nota. R: Recuento N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Para el medio de cultivo Hektoen (tabla 11, 12 y 13), la promoción del crecimiento de los microorganismos diana *Salmonella* Typhimurium y *Shigella flexneri* los valores se encuentran por encima del 50% e inhibición de la cepa interferente *E. coli* según lo establece la USP 61, 2022. (Apéndice B). El crecimiento obtenido para *Salmonella* Typhimurium fue de colonias negras; en este medio de cultivo el citrato de hierro actúa como indicador de la formación de SH₂ en presencia del tiosulfato; mientras que *Shigella flexneri* al no producir SH₂ las colonias características son del mismo color del medio, verde-azuladas negras (Merck, sf, 12th edición, pp 304).

Tabla 11. Promoción e inhibición Hektoen durante el tiempo de vigencia Lote 0429

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <u>Hektoen</u>						Lote: 0429			
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhimurium</i>	91	87	89	85	81	83	82	80	81
<i>S. flexneri</i>	96	94	95	95	91	93	94	98	96
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		

	% de recuperación	Comparabilidad	% de recuperación	Comparabilidad	% de recuperación	Comparabilidad
S. Typhimurium	111%	N/A	105%	0.9	95%	0.9
S. flexneri	123%	N/A	101%	0.9	104%	1.0

Nota. R: Recuento N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Tabla 12. Promoción e inhibición Hektoen durante el tiempo de vigencia 0430

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <u>Hektoen</u>						Lote: 0430			
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
E. coli	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. Typhimurium	87	83	85	85	89	87	87	85	86
S. flexneri	98	96	97	87	91	89	92	94	93
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad	
S. Typhimurium	106%	N/A		110%	0.9		101%	0.9	
S. flexneri	126%	N/A		97%	0.9		101%	1.0	

Nota. R: Recuento N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Tabla 13. Promoción e inhibición Hektoen durante el tiempo de vigencia Lote 0431

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <u>Hektoen</u>						Lote: 0431			
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
E. coli	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. Typhimurium	89	85	87	84	86	85	92	90	91
S. flexneri	92	96	94	92	90	91	94	98	96
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad	
S. Typhimurium	109%	N/A		107%	0.9		107%	1.0	
S. flexneri	122%	N/A		99%	0.9		104%	1.0	

Nota. R: Recuento N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Con relación a los resultados con el medio de cultivo *Burkholderia cepacia* (tabla 14, 15 y 16), se comprobó su productividad con *B. cenocepacia* y *B. cepacia* en los tres lotes y en los tiempos evaluados. Este medio de cultivo es selectivo para estos dos microorganismos, se

desarrollaron colonias de color marrón verdoso y viraje del medio a rosa-fucsia, lo que indica la presencia del Complejo *B. cepacia* (USP 60, 2019). El porcentaje de recuperación fue el esperado mayor al 100% para todos los lotes, sin embargo, a los 30 días de preparado, el porcentaje de recuperación bajó a un 93%, pero aun así el resultado siguió estando dentro de los valores estipulados por la USP 61 ($\geq 50\%$). De igual manera también se logró observar la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* tal y como lo establece la USP 60.

Tabla 14. Promoción e inhibición *Burkholderia cepacia* durante el tiempo de vigencia Lote 0426

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <i>Burkholderia cepacia</i> Lote: 0426									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cenocepacia</i>	88	83	85	90	94	92	94	96	95
<i>B. cepacia</i>	86	80	83	85	89	87	91	95	93
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0		Comparabilidad	Tiempo 15		Comparabilidad	Tiempo 30		Comparabilidad
	% de recuperación			% de recuperación			% de recuperación		
<i>B. cenocepacia</i>	107%		N/A	119%		1.0	97%		1.0
<i>B. cepacia</i>	103%		N/A	108%		1.0	98%		1.0

Nota. R: Recuento N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Tabla 15. Promoción e Inhibición *Burkholderia cepacia* durante el tiempo de vigencia cepacia Lote 0427

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <i>Burkholderia cepacia</i> Lote: 0427									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cenocepacia</i>	85	91	88	93	87	90	92	96	94
<i>B. cepacia</i>	87	83	85	87	89	88	92	90	91
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		

	% de recuperación	Comparabilidad	% de recuperación	Comparabilidad	% de recuperación	Comparabilidad
<i>B. cenocepaea</i>	111%	N/A	116%	1.0	96%	1.0
<i>B. cepacia</i>	106%	N/A	110%	1.0	96%	1.0

Nota. R: Recuento N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

Tabla 16. Promoción e inhibición *Burkholderia cepacia* durante el tiempo de vigencia Lote

0428

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <i>Burkholderia cepacia</i>						Lote: 0428			
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cenocepaea</i>	80	78	84	89	95	92	88	92	90
<i>B. cepacia</i>	88	86	87	92	84	88	90	92	91
% de recuperación respecto al inóculo/comparabilidad del medio									
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad		% de recuperación	Comparabilidad	
<i>B. cenocepaea</i>	106%	N/A		119%	1.0		92%		0.9
<i>B. cepacia</i>	108%	N/A		110%	1.0		96%		1.0

Nota. R: Recuento. N/A: No aplica, debido a que no hay un medio de cultivo previamente aprobado con el cual comparar el medio que se está evaluando.

En cuanto a los resultados obtenidos para el medio de cultivo Fraser descritos en las tablas 17 a la 19 (apéndice B), el ennegrecimiento del medio fue el esperado, demostrando su productividad, así como su selectividad al inhibir el crecimiento del microorganismo interferente, a lo largo de todo el tiempo de vigencia analizado.

Tabla 17. Promoción e inhibición Caldo Fraser durante el tiempo de vigencia Lote 0438

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <i>Caldo Fraser</i>					Lote: 0438				
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	E	E	Promedio	E	E	Promedio	E	E	Promedio
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota. E: Ennegrecimiento. Estos análisis fueron de forma cualitativa, por lo tanto, los resultados fueron sólo indicativos

Tabla 18. Promoción e inhibición caldo Fraser durante el tiempo de vigencia Fraser Lote 0439

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <u>Caldo Fraser</u>			Lote: 0439						
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	E	E	Promedio	E	E	Promedio	E	E	Promedio
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota. E: Ennegrecimiento. Estos análisis fueron de forma cualitativa, por lo tanto, los resultados fueron sólo indicativos

Tabla 19. Promoción e inhibición Caldo Fraser durante el tiempo de vigencia Lote 0440

Aspectos microbiológicos									
Medio de cultivo: <u>Caldo Fraser</u>			Lote: 0440						
Microorganismo	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	E	E	Promedio	E	E	Promedio	E	E	Promedio
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota. E: Ennegrecimiento. Estos análisis fueron de forma cualitativa, por lo tanto, los resultados fueron sólo indicativos

7.1.2 Resultados Físicoquímicos

Los resultados físicoquímicos de los medios de cultivo control durante los tres días del ensayo mostraron los siguientes resultados: para medio Palcam los valores de pH estuvieron entre 7,25 a 7,29 manteniéndose valores cercanos en los tres tiempos evaluados y su color característico rojo; los valores de pH para el medio Hektoen estuvieron entre 7,48 a 7,54, evidenciando su color verde característico; el medio de cultivo *Burkholderia cepacia* tuvo valores pH entre 6,21 a 6,24 y color típico amarillo; el medio Fraser los valores de pH estuvieron entre 7,25 a 7,28 con su color amarillo característico; todos los medios de cultivo mencionados se mantuvieron estables durante los 30 días luego de ser preparados y almacenados a 2°C a 8°C.

Aspectos fisicoquímicos	Tiempo 0			Tiempo 15			Tiempo 30		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
pH	7,28	7,26	7,28	7,26	7,27	7,27	7,25	7,28	7,27
Color	Amarillo			Amarillo			Amarillo		
Estabilidad	N/A			N/A			N/A		
Temperatura de almacenamiento	2°C a 8°C.			2°C a 8°C.			2°C a 8°C.		

Nota. L: Lote (L1= 0438, L2= 0439, L3=0440)

Finalmente, para todos los medios de cultivo, lotes y tiempos ensayados, el porcentaje de recuperación fue mayor al 90% indicando que no se vieron afectados por el tiempo ni la temperatura de almacenamiento (2 a 8°C) y, por lo tanto, son aptos para utilizarse hasta 30 días luego de ser preparados.

9. Conclusiones

Se logró demostrar la productividad (promoción) de cada uno de los medios de cultivo ensayados al obtener porcentajes de recuperación de las cepas diana de por lo menos el 93%, cumpliendo con los requisitos establecidos de mayor a igual al 50%.

Se comprobó la selectividad de cada uno de los medios de cultivo ensayados al no permitir el crecimiento de bacterias interferentes, cumpliendo con las especificaciones establecidas para tal fin.

Se determinó que los medio de cultivos selectivos se mantuvieron estables y fueron favorables para que los microorganismos logaran el crecimiento apropiado en el medio evaluado hasta los 30 días después de su preparación; los resultados no se vieron afectados por las condiciones de almacenamiento, no hubo contaminación alguna ni cambios de su apariencia manteniendo su pH y color bajo las condiciones de refrigeración.

10. Referencias

- Beamonte, B., García, R., Carrasco, B., Gil, Y., Pérez M. (2020). Infecciones por *Listeria monocytogenes*: Análisis de 41 pacientes. *Medicina Clínica*, 155 (2), 57–62.
Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2019.09.023>
- Casado, M., Torrico, G., Medina, M. (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. Recuperado de:
<https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Cerra, M., Fernández, C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., Zarankin, E. (2013). Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Recuperado de: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>
- Díaz, P. (2005). Importancia de la formación de biopelículas de *Listeria Monocytogenes* en la industria de alimentos. Extraído de:
<https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/25571/u271882.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- FDA. Food and Drug Administration. FDA advises drug manufacturers that *Burkholderia cepacia* complex poses a contamination risk in non-sterile, water-based drug products.
<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-advises-drug-manufacturers-burkholderia-cepacia-complex-poses-contamination-risk-non-sterile#:~:text=based%20drug%20products-,FDA%20advises%20drug%20manufacturers%20that%20Burkholderia%20cepacia%2>

0complex%20poses%20a,sterile%2C%20water%2Dbased%20drug%20products&text
=The%20FDA%20advises%20drug%20manufacturers,a%20risk%20of%20hazardous
%20contamination.

Mahenthiralingam, E., Baldwim, A., Dowson, C. (2008). *Burkholderia cepacia* complex
bacteria: opportunistic pathogenes with important natural biology. Japp Microbiol.
2008;104:1539-51.

Méndez, M., Quintos, M., Herrera, A. (s.f.). Control de calidad de medios de cultivo.

Recuperado de:

<https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8164/1/Maricela%20Esteban%20et%20al%2C%20calidad%20medios%20cultivo.pdf>

Merck (s.f.). Microbiology manual 12th edition

Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). Resolución número 3619 de 2013. Por la
cual se expide el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad de
Productos Farmacéuticos, se establece la Guía de Evaluación y se dictan otras
disposiciones.

https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%203619%20de%202013.pdf

Ministerio de Salud y Protección Social. (2016). Resolución número 1160 de 2016. Por la
cual se establecen los Manuales de Buenas Prácticas de Manufactura y las Guías de
inspección de Laboratorios o Establecimientos de Producción, para la obtención del
Certificado de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura. Tomado de:
https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%201160%20de%202016.pdf

- Mirambell, A. (2015). Aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia* complex en pacientes con fibrosis quística. Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Microbiología. Recuperado de:
https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_329293/amv1de1.pdf
- Organización Internacional de Normalización 11290-1 (ISO, 2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.
- Organización Internacional de Normalización 21567 (ISO, 2004). Microbiology off food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Shigella* spp
- Rodríguez, C., Zhurbenko, R. (2018). Manual BioCen De Medios De Cultivo
<https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Rojas, F., López, D., Meza, G., Méndez, A., Ibarra, J., Estrada, P. (2019). El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. Recuperado en:
<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-el-controvertido-complejo-burkholderia-cepacia-S0325754118300038>.
- United States Pharmacopeia USP (2019). Capitulo <60>. Examen Microbiológico De Productos No Estériles: Pruebas Para El Complejo *Burkholderia cepacia*. Tomado de:
https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M12455_02_02 (ingreso con usuario y contraseña)
- United States Pharmacopeia USP (2022). Capitulo <1117>. Buenas Prácticas de Laboratorio. Tomado de: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M613_02_02 (ingreso con usuario y contraseña)

United States Pharmacopeia USP (2022). Capítulo 61. Examen Microbiológico de Productos

No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano. Recuperado de:

https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M98800_01_02 (ingreso con usuario y contraseña)

United States Pharmacopeia USP (2022). Capítulo 62. Examen Microbiológico de Productos

No Estériles: Pruebas de Microorganismos Específicos. Tomado de:

https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M98802_01_02 (ingreso con usuario y contraseña)

Villacrés, I., Alcocer, I., Zurita, J., Rodríguez, M. (2015). Sensibilidad antimicrobiana y

detección de genes de virulencia en aislados clínicos de *Shigella* spp. Recuperado de:

<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6362852.pdf>