

**VALIDACIÓN PRELIMINAR PARA LA DETECCIÓN DE *Escherichia coli*
Candida albicans y *Aspergillus brasiliensis* EN EL PRODUCTO
FARMACÉUTICO ENZYMED**

DANITZA MEDINA CABARCAS

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2018**

**VALIDACIÓN PRELIMINAR PARA LA DETECCIÓN DE *Escherichia coli*
Candida albicans y *Aspergillus brasiliensis* EN EL PRODUCTO
FARMACÉUTICO ENZYMED**

DANITZA MEDINA CABARCAS

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE MICROBIÓLOGA

**Tutora: Claudia Clavijo Olmos PhD
Universidad de Pamplona**

**Tutor: Gonzalo Andrés Suarez Jaimes
Microbiólogo Industrial y Ambiental Universidad de Antioquia
MsC. Calidad y Gestión Integral**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2018**

Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

Pamplona (Norte de Santander - Colombia), 12 de junio 2018.

DEDICATORIA

Este trabajo no sólo es la conclusión de una meta cumplida, también significa un nuevo escalón de mi propio destino, una pequeña pausa para celebrar la culminación de una larga carrera que en el trayecto me abrió nuevos horizontes y me enseñó lo importante que es cada persona en el camino; En especial este trabajo quiero dedicarlo a mi hermana, Zeyda Rocío Medina Cabarca, quien nunca dudo en darme ánimo cuando llegué a decaer, me acompañó en esos momentos en que pensé en renunciar y me impulso a seguir con más fuerza, nunca fue un impedimento sus propios problemas porque siempre estuvo dispuesta a ayudarme y lo hizo, por eso siento que esta victoria no es sólo mía.

*Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes,
porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas.*

Josué 1:9

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por todas las bendiciones que me regala cada día de mi vida, a mi hermosa familia por todo el apoyo y amor que me brindan cada día.

Agradezco a el laboratorio Laser Pharmaceutica y a todas aquellas personas que me guiaron en la elaboración de mi trabajo de grado en especial a mis tutores.

Agradezco a la universidad de pamplona y a los docentes del programa de microbiología por la formación académica brindada durante mi carrera y permitirme ser una gran profesional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. FORMULACION DEL PROBLEMA	14
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. OBJETIVOS	16
5.1. General	16
5.2. Específicos	16
6. MARCO REFERENCIAL	17
6.1 ANTECEDENTES	17
6.2 MARCO LEGAL	17
6.3 MARCO TEORICO.	18
6.3.1. Aptitud del método	18
6.3.2. Microorganismos en productos farmacéuticos no estériles	19
6.3.3. Generalidades.	20
6.3.3.1 Escherichia coli	20
6.3.3.2. Enfermedades	20
6.3.3.3. Escherichia coli enteropatógena (EPEC)	20
6.3.3.4. Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)	20
6.3.3.5. Escherichia coli entero-hemorrágica (EHEC)	21
6.3.3.6. Hongos.	21
6.3.3.7. Aspergillus sp.	21
6.3.3.7.1. Las aflatoxinas	22
6.3.3.7.2. La ocratoxina A:	23
6.3.3.8. Levadura	24
6.3.3.8.1. Candida albicans.	25
6.3.3.8.2. Características.	25
6.3.3.8.3. Reservorio	25
6.3.3.8.4. Supervivencia ambiental	25
6.3.3.8.5. Mecanismo de propagación y transmisión:	25

6.3.3.8.6. Infección y efectos alérgicos	25
6.3.3.8.7. Efectos en la maternidad.....	26
6.3.4. Técnicas rápidas para la detección de microorganismos	26
6.3.4.1 Placas Petrifilm™	26
6.3.4.2. Placas 3M™ Petrifilm™ <i>E. coli</i> /Coliformes.....	26
6.3.4.3. Placa 3M™ Petrifilm™ Rápida para recuento de Hongos y Levaduras.....	27
6.3.4.3.1. Recuento de Hongos.....	28
6.3.4.3.2. Recuento de levaduras.....	28
6.3.4.3.3. Crecimiento y formación de la colonia	28
6.3.5. Productos farmacéuticos:	28
6.3.5.1. Enzymed.	28
6.3.6. Validación.	29
6.3.7 Parámetros cuantitativos.....	29
6.3.7.1. Precisión.....	29
6.3.7.2. Repetibilidad.	29
6.3.7.3. Reproducibilidad.....	29
7. METODO.....	30
7.1. Tipo de investigación.	30
7.2. Población.....	30
7.3. Muestra.	30
7.4. Microorganismos.	30
8. METODOLOGIA	31
8.1. Preparación de las cepas.....	31
8.2. Promoción de crecimiento.....	31
8.3. Prueba de Presencia/Ausencia.....	32
Características macroscópicas.....	32
8.4 Evaluación del producto Enzymed en TSB+Tween VS TSB.....	32
8.5. Preparación de la muestra.....	33
8.6. precisión intermedia	33
8.7. Métodos Estadísticos.....	33
8.7.1. Precisión	33

8.7.2. Repetibilidad.....	34
8.7.3. Reproducibilidad.....	34
8.8. Análisis microbiológico convencional.....	34
8.8.1 Recuento <i>Escherichia coli</i>	34
8.8.2. Recuento Hongos y Levaduras.....	34
8.9. Recuento microbiológico rápido.....	35
8.9.1. Placas 3M™ Petrifilm para el Recuento de <i>E. coli</i> /coliformes	35
8.9.2. Placas 3M™ Petrifilm para el Recuento de Hongos y Levaduras.....	35
10. Análisis de costo beneficio (CBA)	35
11. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.	36
Tabla 5: Cronograma de actividades a ser desarrolladas en la ejecución del proyecto	36
12. RESULTADOS Y DISCUSION.	38
12.1. Resultados promoción y crecimiento.	38
12.2. Resultados Prueba de Presencia/Ausencia.....	39
12.3. Ensayos preliminares evaluando del producto Enzymed en TSB+TWEEN vs TSB.....	39
12.4. precisión intermedia	43
12.4.1 Recuento Control Cepas	43
12.5. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS EVALUADOS	46
12.5.1 Precisión	46
12.5.2. Repetibilidad.....	47
12.2.2. Reproducibilidad.....	48
14. CONCLUSIONES	56
15. GLOSARIO	57
16. BIBLIOGRAFIA	59
17. ANEXOS	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Lotes utilizados en los ensayos preliminares para la validación	30
Tabla 2: Cepas estandarizadas utilizadas en el producto Enzymed.....	31
Tabla 3: Promoción de crecimiento Escherichia coli	32
Tabla 4: Promoción de crecimiento Candida albicans y Aspergillus brasiliensis	32
Tabla 5: Cronograma de actividades a ser desarrolladas en la ejecución del proyecto	36
Tabla 6: Cronograma de actividades desarrolladas en la empresa Laser Pharmaceutica para el control de calidad	37
Tabla 7: Promoción y crecimiento	38
Tabla 8: Presencia/ausencia de E.coli, C. albicans, A. brasiliensis	39
Tabla 9: Concentración del inóculo método convencional.....	40
Tabla 10: Concentración del inóculo en Placas Petrifilm	40
Tabla 11: Resultados evaluación del producto Enzymed tabletas +TSB + Tween 80 al 1% en método convencional.....	41
Tabla 12: Resultados evaluación del producto Enzymed tabletas +TSB + Tween 80 1% en Placas Petrifilm.	41
Tabla 13: Resultados evaluación del producto Enzymed Tabletetas + TSB en método convencional.	42
Tabla 14: Resultados evaluación del producto Enzymed Tabletetas + TSB en Placas Petrifilm.	42
Tabla 15: Concentración del inóculo Método Convencional.	43
Tabla 16: Concentración del inóculo Método Petrifilm.....	43
Tabla 17: Precisión intermedia de microorganismos estandarizados.....	44
Tabla 18: Precisión intermedia de microorganismos estandarizados.	44
Tabla 19: Resultados Medio Selectivo y Placas Petrifilm.	45
Tabla 20: Concentración del inóculo en método convencional.....	46
Tabla 21: Concentración del inóculo en Método Petrifilm.....	46
Tabla 22: Precisión de microorganismos estandarizados en presencia de producto.	47
Tabla 23: Precisión de microorganismo estandarizado en presencia del producto	47
Tabla 24: Repetibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (analista II).....	48
Tabla 25: Repetibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (Analista II).	48
Tabla 26: Reproducibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (Analista 1)	49
Tabla 27: Reproducibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (Analista 1)	49

Tabla 28: Resultados producto Enzymed tabletas en método convencional.....	51
Tabla 29: Resultados del producto Enzymed tabletas Placas Petrifilm.	52
Tabla 30: Resultados de costo para la ejecución del proyecto utilizando placas petrifilm.....	53
Tabla 31: Resultados de costo para la ejecución del proyecto utilizando placas petrifilm.....	54

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructura química aflatoxinas.	22
Figura 2: Estructura química ocratoxina A.....	23
Figura 3: Estructura placa petrifilm.....	26
Figura 4: Estructura placas petrifilm para recuento E. coli/Coliformes	27
Figura 5: Estructura placas petrifilm para recuento rápido Hongos y Levaduras .	27

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Registro fotográfico de los ensayos preliminares para la validación utilizando la aptitud del método en el laboratorio Laser Pharmaceutica utilizando método convencional y placas petrifilm).....	66
Anexo 2: Aptitud del metodo establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos de America.....	71

1 INTRODUCCIÓN

Durante muchos años el hombre ha utilizado los recursos que le provee la naturaleza para mantener o restablecer la salud, utilizando para ello técnicas y procedimientos que, en la actualidad, se han transformado en grandes compañías de producción masiva como la industria farmacéutica. Allí, además de la producción diversificada, se presenta también la exposición a agentes externos que pueden alterar las composiciones de las formulas; entre ellos la contaminación microbiana en productos farmacéuticos, visto como un problema común que se ha informado para varios medicamentos no estériles. Quizás sea un poco sorprendente que el problema de la contaminación microbiana en medicamentos no estériles haya recibido una atención detallada recientemente, esto debido a que depende, principalmente, de la calidad de las materias primas, equipos de producción, ambientes de producción, proceso de producción, material de empaque, buenas prácticas de manufactura (BPM) y las condiciones de almacenamiento.

Los parámetros ambientales, incluidos la temperatura y humedad relativa, también pueden tener un significativo impacto en la contaminación microbiana de los productos farmacéuticos. Esto se puede evidenciar en las presentaciones de dosificación sólidas (cápsulas o tabletas) soluciones oftálmicas, supositorios, pomadas, en cosméticos como jabones, talcos, y otros que contienen nutrientes ricos en hidratos de carbono y ácidos grasos que son susceptibles a la contaminación por una variedad de microorganismos durante la fabricación y uso. Las causas más significativas son el deterioro del producto, los cambios en sus características físicas, químicas, organolépticas, componentes o incluso transformándolos en subproductos dañinos; por lo que se puede evidenciar, cambio de color, producción de malos olores y alteración de las propiedades reológicas.

Estos cambios no solo harán que el producto sea inaceptable, no conforme, también pueden afectar la administración de la dosis. La presencia de estos microorganismos en productos farmacéuticos y cosméticos se ha estudiado extensamente tanto a nivel nacional como internacional, la cual demostró ser un peligro potencial para la salud del consumidor. La mayoría de los contaminantes de productos farmacéuticos son bacterias, Levaduras y Hongos filamentosos (Moho). Algunos de estos contaminantes patógenos, incluyen *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Estos microorganismos contaminantes poseen la característica de adaptarse fácilmente a condiciones nutricionales mínimas y son capaces de reproducirse en cualquier etapa de la fabricación del producto. (El-Houssieny, Aboulwafa, Elkhatib, & Hassouna, 2013).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el avance de la ciencia a lo largo de la historia de la humanidad y la incorporación de la tecnología como componente innovador de las últimas décadas, gran parte de los procesos y procedimientos de los diferentes campos de la industria se han modificado para mejorar la eficiencia y efectividad; trayendo, además, beneficios en materia de salud para la población humana.

Sin embargo, las técnicas microbiológicas clásicas todavía se usan ampliamente en era moderna para diferentes procedimientos en el control de calidad de la industria farmacéutica; además de algunos análisis para la investigación (Verdonk, *et al.*, 2010). Asimismo, estos métodos implican gastos, requieren tiempo, aunque sencillo, son laboriosos, requiere un volumen considerable de tubos de ensayo y medio de dilución, espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo. Los tiempos de incubación para recuento de patógenos son de $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5$ durante un periodo de 48 a 72h, y recuento de Hongos y Levaduras $22^{\circ}\text{C} \pm 2.5$ durante un periodo de 5- 7 días según lo establecido USP 40 NF-35 (2017) <61>

La sociedad actual exige mayor concentración en la seguridad farmacéutica y los requisitos de calidad son cada vez más estrictos; por esto, los laboratorios están bajo presión para diseñar pruebas que sean rápidas, confiables, consistentemente precisas y fáciles de interpretar; en pro del mejoramiento de las condiciones y calidad de los productos que sacan al mercado porque inciden directamente sobre la salud pública de cual región o país.

Debido a esta necesidad, se propone evaluar las Placas Petrifilm™, para el recuento rápido de *E. coli*/Coliformes, Hongos y Levaduras; las cuales fueron desarrolladas en el campo de la microbiología para estandarizar y simplificar procedimientos de recuento microbiológico. Su constitución hace que estas sean utilizadas para la detección de contaminación microbiana en materias primas y productos terminados, además de ser empleadas para el control ambiental.

Asimismo, aplicar las placas petrifilm™ hace más eficiente y simple el proceso de muestreo microbiológico, ya que trae incorporado una nueva tecnología de indicadores haciendo que las colonias sean más fáciles de interpretar. Este sistema de medios listos para la muestra proporciona resultados en tan solo 48 horas de tiempo de incubación, aumenta la productividad y disminuye errores humanos (Netmati *et al.*, 2016)

3. FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Qué porcentaje de recuperación se obtendría empleando la aptitud del método en placas petrifilm y convencionales para la detección de *Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans* en el producto farmacéutico enzimed?

4. JUSTIFICACIÓN

La industria farmacéutica es el sector empresarial que se encarga de la fabricación y comercialización de productos que puedan ayudar a mantener la salud en las personas o a contrarrestar alguna afectación. Su influencia directa se proyecta sobre la salud humana por lo que las reglamentaciones y controles en los procesos y procedimientos se hacen más rigurosos que en otros campos.

En la actualidad, esta industria a nivel mundial se ha preocupado por la investigación y mejoramiento de las condiciones y calidad de sus productos, a fin de mitigar los riesgos y vectores potenciales de contaminación y contagio. Asimismo, con el avance de la tecnología, los aportes hechos en esta materia son significativos al poder utilizarlos tanto para la investigación, como para la producción y comercialización.

Sin embargo, con estos avances e innovaciones, se empiezan a presentar, igualmente, evolución y resistencia de los virus y bacterias, incursionando también, en ambientes no tolerables o con recursos antes no utilizados; como en el variado insumo de la industria farmacéutica. Por estas razones, se hace necesaria la validación de métodos rápidos para la detección e identificación de bacterias, Hongos y Levaduras presentes en productos farmacéuticos; en este caso las Placas Petrifilm™ para el recuento rápido de *E. coli*/Coliformes, Hongos y Levaduras, teniendo en cuenta parámetros estadísticos específicos, como son: precisión, repetibilidad, reproducibilidad.

Adicionalmente, se justifica la escogencia de las Placas Petrifilm™, por la eficiencia y confiabilidad de resultados frente a otras técnicas; proporcionando aceleración y controlando el crecimiento microbiano debido a que contiene un sistema de gel solubles en agua fría que se rehidratan al depositar la muestra en la superficie y que requieren un espacio mínimo para su almacenamiento e incubación; obteniendo así resultados en menos tiempo. Además, se ha seleccionado para esta investigación el producto Enzimed, producido por la empresa **Biochem Farmacéutica de Colombia, Ltda.** ubicada en la ciudad de Bogotá D.C.; para ser analizado en las instalaciones de los laboratorios de Laser Farmacéutica S.A.S, también en la capital del país.

Del mismo modo, se debe hacer una revisión bibliográfica minuciosa, el referenciación teórico correspondiente, el análisis, las pruebas de campo, la comprobación, las conclusiones, recomendaciones y discusión de los hallazgos encontrados a fin de establecer parámetros de medición y fundamentación teórica para otros investigadores, la industria farmacéutica y la comunidad científica internacional

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Desarrollar la primera fase de la validación de la aptitud del método en placas petrifilm y método convencional para la detección de *Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans* en el producto farmacéutico Enzimed.

5.2. Específicos

- Realizar la precisión intermedia de la estandarización del inóculo validado por la empresa Laser Farmacéutica S.A.S.
- Evaluar el porcentaje de recuperación de los microorganismos específicos según los parámetros farmacopéicos en técnicas convencional y placas petrifilm.
- Determinar la precisión, repetibilidad, reproducibilidad en técnicas convencionales y placas petrifilm.
- Realizar un análisis de costo-beneficio en técnicas convencionales y placas petrifilm.

6. MARCO REFERENCIAL

6.1 ANTECEDENTES.

Estudios han sido reportados para Verificación de la aptitud de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos para productos terminados elaborados en Anglopharma S.A. Perilla, (2013) demostró mediante las pruebas de enumeración y recuperación de microorganismos específicos que el método, para análisis microbiológico de productos no estériles, de la USP vigente, es apropiado para analizar los productos terminados de naturaleza semisólida, líquida, productos de uso vaginal y cápsulas de gelatina dura elaborados en Anglopharma S.A. Para evaluar la confiabilidad de las técnicas en los productos de naturaleza, se realizaron recuentos de Aerobios Mesófilos, Hongos y Levaduras. Los recuentos se realizaron con cepas liofilizadas las cuales son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* y *Salmonella typhimurium*, cada microorganismo se utilizó dependiendo lo establecido, en la USP 37 capítulo <61>, para cada producto.

Un estudio realizado por Sueros, (2013) donde validaron un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial siguiendo las recomendaciones de la “United States Pharmacopea XXXIV” (USP 34). Para la ejecución del presente trabajo se usó un producto farmacéutico líquido Tyrex jarabe (Teofilina 27 mg/5 mL jarabe). Asimismo, trabajaron con cepas estándares sugeridas por la USP34 como: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404; y para los ensayos cualitativos se usó: *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

6.2 MARCO LEGAL.

6.2.1. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA USP 40 NF-35 (2017) <1223>. Validación de métodos microbiológicos alternativos. Con el fin de implementación de métodos alternativos de valoración para analizar artículos Farmacopéicos.

6.2.2. RESOLUCIÓN 003619 DE 2013 (17 SET.) 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

6.2.3. RESOLUCIÓN 1403 DE 2007 (14 de mayo) Por la cual se determina el Modelo de Gestión del Servicio Farmacéutico, se adopta el Manual de Condiciones Esenciales y Procedimientos y se dictan otras disposiciones.

6.2.4. DECRETO 677 DE 1995 (abril 26) Por el cual se reglamenta número parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a base de Recursos Naturales, Productos de Aseo, Higiene y Limpieza y otros productos de uso doméstico y se dictan otras disposiciones sobre la materia.

6.2.5. DECRETO 2078 del 2012 (Oct 8) Por el cual se establece la estructura del instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA y se determinan las funciones de sus dependencias.

Artículo 2°. Objetivo. El INVIMA tiene como objetivo actuar como institución de referencia nacional en materia sanitaria y ejecutar las políticas formuladas por el Ministerio de Salud y Protección Social en materia de vigilancia sanitaria y de control de calidad de los medicamentos, productos biológicos, alimentos, bebidas, cosméticos, dispositivos y elementos médico-quirúrgicos, odontológicos, productos naturales homeopáticos y los generados por biotecnología, reactivos de diagnóstico, y otros que puedan tener impacto en la salud individual y colectiva de conformidad con lo señalado en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993 y en las demás normas que la modifiquen, adicionen o sustituyan.

6.2.6. RESOLUCION 1478 DE 2006 (mayo 10) Por la cual se expiden normas para el control, seguimiento y vigilancia de la importación, exportación, procesamiento, síntesis, fabricación, distribución, dispensación, compra, venta, destrucción y uso de sustancias sometidas a fiscalización, medicamentos o cualquier otro producto que las contengan y sobre aquellas que son monopolio del Estado.

6.3 MARCO TEORICO.

6.3.1. Aptitud del método

La aptitud del método se lleva a cabo inoculando de forma artificial una concentración a no mayor 100 UFC de los microorganismos ***E. coli***, ***Candida albicans*** y ***Aspergillus brasiliensis***, a su vez se tiene en cuenta las condiciones definidas para la preparación de la muestra, su naturaleza, las condiciones de crecimiento como: temperatura y tiempo de crecimiento en sustratos definidos mediante recuento en placas y placas petrifilm, así mismo se verifica que el método es confiable y que se logra recuperar una concentración conocida con la concentración del inóculo inicial no mayor al >70%.

6.3.2. Microorganismos en productos farmacéuticos no estériles

El microorganismo se define como un ser vivo que puede proliferar en un producto afectando negativamente las propiedades físicas y terapéuticas del mismo. Además, dependiendo del grado de presencia y la patogenicidad, puede causar infección en el paciente cuando es tratado con ese producto farmacéutico. (Submitted *et al.*, 2012) Según el Manual de Buenas prácticas de la Organización Mundial de la Salud-OMS (2013) “los laboratorios de microbiología farmacéutica pueden involucrarse en: ensayos de esterilidad; detección, aislamiento, recuento e identificación de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) y pruebas de endotoxinas bacterianas en diferentes materiales (ej. Materia prima, agua), productos, superficies, vestimentas y el medio ambiente”. Además, también pueden encargarse de hacer valoraciones usando microorganismos como parte del sistema de pruebas.

Por su parte, la Universidad Central de Venezuela en la guía de control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no estériles señala que se deben utilizar otras formas de comprobar la presencia de *E. coli* por medio de pruebas bioquímicas adicionales como por ejemplo el Test del IMViC, o utilizando sistemas miniaturizados tales como API® o MicroID®. (UCV, 2012).

Con respecto a los Hongos, la Clasificación Industrial Internacional Uniforme (CIIU) señala que “la mayor parte de los antibióticos proceden del metabolismo secundario de microorganismos procariontes (actinomicetos, *Bacillus*, etc) o eucariotas (Hongos de los géneros *Penicillium*, *Cephalosporium*, etc)”; Lo que en su presencia en la fabricación de productos de este tipo en la industria farmacéutica está inmerso desde sus inicios. Sin embargo, también es importante durante el proceso de selección y preparación de la materia prima “el secado para reducir el riesgo de contaminación por la proliferación de hongos, lo cual se logra eliminar la humedad en un 10 % aproximadamente.”.

En cuanto a las levaduras (Cera, *et al.*,2009), define que: “las levaduras son esencialmente hongos unicelulares que, aunque son morfológicamente simples constituyen un grupo altamente especializado asociados con ambientes nutricionales muy dispares. Unas pocas especies de levaduras son potencialmente patógenas para el hombre, aunque muchas están relacionadas con procesos de alteración de producto”. Además, señalan que “Las preparaciones farmacéuticas y los cosméticos pueden contaminarse con hongos filamentosos, levaduras y bacterias”. Por su parte, las buenas prácticas de manufactura de la Comisión Europea, advierten que “las materias primas naturales, el equipamiento, el agua, los operadores, el aire, y el material de empaque pueden ser fuentes de contaminación de los productos farmacéuticos y cosméticos”.

6.3.3. Generalidades.

6.3.3.1 Escherichia coli.

Escherichia coli se caracteriza por ser un Bacilos Gram negativos, aerobio, móviles mediante flagelos peritricos y puede producir microcápsula. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Por otro lado, sus reacciones bioquímicas características son indol positivo, puede producir toxinas y es resistente a antibióticos. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Su presencia se encuentra tanto en la industria alimentaria como farmacéutica, evidenciándose ambientes y condiciones especiales para su proliferación. “Además de la temperatura, el pH y la actividad de agua pueden influir en la proliferación de *E. coli*. Las condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7,2 y 0,99 respectivamente. El desarrollo de *E. coli* se detiene a pH extremos (inferiores a 3,8, o superiores a 9,5), y valores de a_w inferiores a 0,94”. (Manual de Seguridad e Higiene de la empresa española Betelgeux 2018),

6.3.3.2. Enfermedades

En cuanto a las infecciones, esta bacteria se presenta comúnmente al interior del intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente, sin representar riesgo mayor, aunque algunas especies pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. Además, otras cepas pueden producir infecciones del tracto urinario, y entéricas; ocasionalmente, septicemia y meningitis.

6.3.3.3. Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

Es uno de los serotipos y se encuentran entre los más importantes por la afectación a infantes en todo el mundo; debido a su alta prevalencia tanto en la comunidad como en el entorno hospitalario es una de las principales causas de enfermedades diarreicas entre los niños pequeños en los países en desarrollo. Un fenotipo característico de EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena) es la capacidad de producir lesiones de fijación y borrado (A/E). Unos de los genes responsables de la formación de lesiones son: A/E se encuentran en una isla de patogenicidad cromosómica, conocida como el locus del borrado de enterocitos (LEE); este contiene un conjunto de genes, incluido el gen intimina (EAE), que desempeña un papel crucial en el fenotipo A/E.

EPEC se puede clasificar además en EPEC típica (tEPEC) y EPEC atípica (aEPEC), dependiendo de la presencia o ausencia del factor de adherencia del plásmido *E. coli* (EAF). Además, el EAF tiene un operón importante para el pilis formador de haces (BFP), una adhesina fimbrial de tipo IV, que contribuye al fenotipo de la adherencia localizada (AL) a las monocapas de células HEp-2. Mientras que tEPEC, llamada clase I EPEC.(Wang *et al.*, 2013).

6.3.3.4. Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)

Sigue siendo una de las principales causas de diarrea infantil y es un problema de salud mundial. La ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica) causa enfermedad al

adherirse al epitelio del intestino delgado por medio de diferentes factores de colonización. Las dos principales toxinas de ETEC, la toxina lábil al calor (LT) y la toxina estable al calor (ST), se unen a los receptores entéricos del epitelio y finalmente provocan la desregulación del CFTR del canal de cloruro, lo que conduce a una mayor secreción de iones cloruro, bicarbonato y electrolitos. Consecuentemente, LT es una toxina AB codificada por *eltA* y *eltB* genes en un operón y los péptidos LTA y LTB se secretan a través de mecanismos *dependientes de sec al periplasma y ensamblados por DsbA*. La secreción a través de la membrana externa ocurre a través del sistema de secreción tipo II (T2SS). (Contreras, 2011)

6.3.3.5. Escherichia coli entero-hemorrágica (EHEC)

Conjunto de patógenos, que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos. En ocasiones, la colitis hemorrágica deriva en síndrome urémico hemolítico (SUH), una causa importante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos; en los ancianos, la tasa de letalidad por el SUH puede elevarse al 50%. La *Escherichia coli* entero-hemorrágica O157:H7 (EHEC O157:H7) ha sido reconocida como la causa de este síndrome desde la década de 1980; verificando que los reservorios de la EHEC O157:H7 son los rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, que se infectan sin presentar síntomas y eliminan el organismo en las heces. Otros animales como conejos y cerdos también pueden transportar este organismo. Por su parte, los humanos adquieren la EHEC O157:H7 por contacto directo con los portadores animales, sus heces y el suelo o agua contaminados. (Gomes *et al.*, 2016)

6.3.3.6. Hongos.

Son organismos eucariotas, es decir, presentan núcleo verdadero con membrana nuclear y cromosomas; son unicelulares y pluricelulares, además de heterótrofos, ya que sintetizan la materia orgánica a partir de CO₂. Se caracterizan por no formar tejidos teniendo su cuerpo una estructura talofítica estando formado por una serie de filas o hileras de células denominadas hifas que en conjunto constituyen el micelio. Sus células presentan una pared celular que en muchos casos no está formada de celulosa sino de quitina, digiriendo los alimentos externamente con liberación de enzimas y ácidos que hidrolizan las macromoléculas del sustrato para ser absorbidas. Los hongos patógenos aislados con más frecuencia son cepas de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* por ser hongos que producen micosis sistémica en pulmón llamada Aspergillosis (Morales 2009).

6.3.3.7. Aspergillus sp.

Aspergillus un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo *Ascomycota*, que se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios). Las diferentes especies se clasifican en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia:

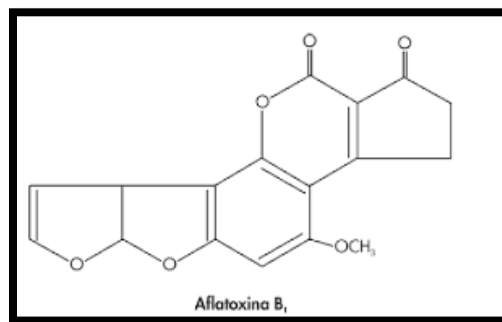
verde-amarillento (*A. flavus*), negro (*A. niger*), marrón (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales.

Este es uno de los principales hongos productores de micotoxinas; que son metabolitos secundarios producidos y secretados por los hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos(Angelina, *et al.*, 2008). Las micotoxinas, producidas particularmente son las aflatoxinas (AFT) y la ocratoxina A (OTA) es un carcinógeno puedes causar cáncer en el tracto urinario y daño renal, las cuales representan una amenaza importante en la salud humana. (Adeyeye, 2016).

6.3.3.7.1. Las aflatoxinas

Pertenece a la familia de las difuranocumarinas, y se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química; la serie 1 difuro-cumarú-ciclo-pintamonas (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y aflatoxicol) y la serie 2 difuro-cumaro-lactonas (AFG1, AFG2, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFGM2A y AFB3). Sin embargo, las más importantes son B1, B2, G1 y G2, distinguidas por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta (azul y verde)(Zumbado *et al.* 2014)

Pueden formarse tanto en el cultivo del alimento en campo de cereales (principalmente maíz) y todo tipo de frutos secos, como durante la recolección, transporte y almacenamiento. Todas las aflatoxinas son carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas, pero la aflatoxina B1 es considerada la más tóxica estando clasificada como cancerígena para el ser humano; junto a la aflatoxina M1, como posiblemente cancerígena para el ser humano.(Fundación elika, 2013)



Fuente: (Zumbado *et al.* 2014)

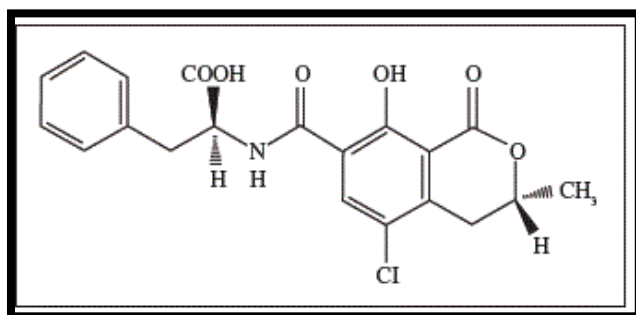
Figura 1: Estructura química aflatoxinas.

6.3.3.7.2. La ocratoxina A:

La Ocratoxina A (OTA) ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) es una molécula formada por un anillo de 3,4- dihidro metil isocumarina unido, por medio de su grupo carboxilo y través de un enlace tipo amida, a una molécula de fenilalanina. Es muy estable, incolora, soluble en disolventes orgánicos polares, poco soluble en agua, con características de ácido débil y capaz de emitir fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta.

Los cereales, piensos, humano y animales, son las principales fuentes de contaminación, aunque también pueden encontrarse niveles notables de contaminación en otros alimentos. Los granos de café verde, la carne y sus derivados, las uvas, el vino, las pasas e higos secos, el chocolate, las legumbres, la cerveza y las especias, constituyen fuentes dietéticas a considerar sólo en caso de altas ingestas. Otras fuentes no convencionales de OTA son el té, las infusiones, el regaliz, el aceite de oliva y los alimentos infantiles a base de cereales.

Además de la OTA, existen otros tipos de ocratoxinas como son la ocratoxina B (OTB) que se caracteriza por ser un derivado no clorado de la OTA con carácter menos tóxico y la ocratoxina C (OTC) éster de la OTA con escaso potencial tóxico; ambos productos del hidrólisis de OTA y OTB, respectivamente, que se caracterizan por carecer de toxicidad. “Puede causar cáncer en el tracto urinario y daño renal”. (Ravelo *et al.*, 2011)



Fuente: (Ravelo *et al.*, 2011)

Figura 2: Estructura química ocratoxina A.

6.3.3.7.3. Supervivencia ambiental.

Crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materia orgánica en descomposición; además, es un contaminante habitual de los conductos de climatización o ventilación y es termotolerante porque puede vivir entre los 12°C y los 57°C, incluso, las esporas pueden soportar temperaturas 70°C.

6.3.3.7.4. Mecanismo de propagación y transmisión.

La transmisión se produce principalmente por medio de las esporas o conidios que se encuentran presentes en el ambiente en forma de bioaerosoles y penetran en el organismo por vía respiratoria. También es posible la transmisión por contaminación de heridas o mucosas y la aparición de efectos tóxicos por ingestión de alimentos contaminados y son responsables de casos de enfermedad nosocomial.

6.3.3.7.5. Infecciones y efectos alérgico.

Es un patógeno oportunista que causa infecciones locales y superficiales como las micosis (otomicosis, onicomosis, queratitis) y el aspergiloma o bola fúngica que se desarrolla en una cavidad como en una lesión pulmonar, producida por una enfermedad pulmonar previa o en un seno nasal en individuos con el sistema inmunitario debilitado, *A. flavus* y *A. terreus* pueden producir infecciones invasivas, como la aspergilosis invasiva diseminada, que cursa de forma grave con neumonía, afectando al pulmón y con la posibilidad de diseminarse a otros órganos

El asma, rinitis y alveolitis alérgica extrínseca o neumonitis por hipersensibilidad, enfermedad pulmonar son afectaciones que puede desarrollarse después de la exposición a conidios del hongo, normalmente en trabajos pulvígenos: manipulación de heno mohoso (*A. flavus*), de paja enmohecida (*A. versicolor*), de cebada enmohecida (*A. clavatus*) o de cacahuetes enmohecidos (*A. niger*), (Sorribes, 2008)

6.3.3.8. Levadura

Las levaduras están agrupadas en unas 350 especies clasificadas en 39 géneros, constituyendo un pequeño grupo dentro de los hongos, que son esencialmente hongos unicelulares, diploide asexual (forma de levadura), saprófito de la familia de los *Saccharomycetaceae* y microscópicamente son células que se reproducen por gemación. Unas pocas especies de levaduras son potencialmente patógenas para el hombre, aunque muchas están relacionadas con procesos de alteración de producto.

Para Vera (2009): "A pesar de que se conoce una gran cantidad de antibióticos producidos por hongos, sólo unos pocos han podido ser utilizados para el tratamiento de enfermedades debido a la alta toxicidad de la mayoría".

Por otra parte, recientemente, se ha generado un creciente interés en las levaduras capaces de crecer a temperaturas elevadas, ya que presentan ventajas en distintos procesos industriales con respecto a las levaduras que no tienen esta cualidad (Koedrit *et al.*, 2008).

Para Mejía *et al.* (2016): "Las levaduras resistentes a altas temperaturas son denominadas levaduras termotolerantes, sin embargo, no existe un valor absoluto de temperatura, ya que los límites a partir de los cuales se consideran levaduras termotolerantes varían en la literatura".

6.3.3.8.1. Candida albicans.

6.3.3.8.2. Características.

Es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. Perteneciendo al filo *Ascomycota* se reproduce de forma asexual por gemación: en forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio.

El dimorfismo también le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped: en forma de levadura se comporta como saprofito, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas

6.3.3.8.3. Reservorio

En Humano la (microflora de la piel, la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, el sistema genitourinario y las heces fecales del hombre).

6.3.3.8.4. Supervivencia ambiental

Sobrevive fuera del huésped, normalmente en zonas húmedas y oscuras

6.3.3.8.5. Mecanismo de propagación y transmisión:

Transmisión es endógena por contacto a través de la piel y las mucosas y por inoculación accidental o mordedura. Es responsable de casos de enfermedad nosocomial.

6.3.3.8.6. Infección y efectos alérgicos

Candidiasis o moniliasis: producen infección superficial que aparece principalmente en individuos con las defensas bajas, afectando a la piel (intertrigo), a las mucosas (oral, genitourinaria o digestiva) y a las uñas (paroniquia o perionixis). Los síntomas son leves como: enrojecimiento, picazón y malestar. En personas con cáncer, trasplantados o con SIDA la infección puede hacerse sistémica (candidemia), y puede llegar a ser mortal.

La asociación entre *Candida albicans* y alergia es controvertida a excepción de los cuadros alérgicos que con escasa frecuencia se observan en pacientes con colonización o infección cutaneomucosa. Sin embargo, las pruebas de reactividad cutánea con extractos de *Candida albicans* son positivas en un elevado número de personas y las pruebas de provocación bronquial han mostrado reactividad clínica en algunos pacientes. (Tanaka, 2012)

6.3.3.8.7. Efectos en la maternidad.

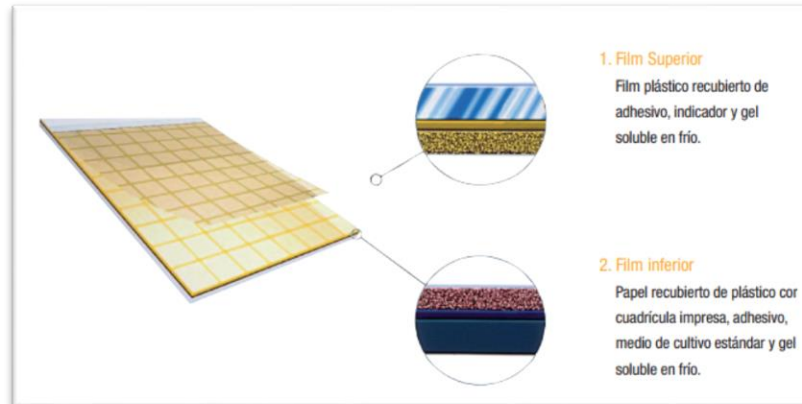
Candidiasis cutánea congénita (CCC) es una infección intrauterina congénita muy poco frecuente, se adquiere por vía ascendente desde el tracto genital de la madre y se manifiesta de forma sistémica o cutánea en los seis primeros días de vida; además se ha referenciado que la candidiasis cutánea neonatal también es una infección adquirida durante el parto.

Normalmente es un huésped de la flora intestinal del hombre, se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina, produce candidiasis superficial o sistémica en personas debilitadas, en recién nacidos y en ancianos con sistema inmunológico deficiente. (Jasso, 2011)

6.3.4. Técnicas rápidas para la detección de microorganismos

6.3.4.1 Placas Petrifilm™.

Método microbiológico que consiste en una familia de placas listas para usarse; diseñadas para ofrecer ahorro de tiempo, minimizar el lapso de crecimiento de los microorganismos, además de aumentar la productividad, fiabilidad y eficiencia de los resultados. Su diseño tiene una película rehidratable cubierta con nutrientes y agentes gelificantes que proporcionan resultados en tres pasos: inoculación, incubación y recuento. Las placas petrifilm™ están disponibles para la mayoría de las necesidades de pruebas microbiológicas incluyendo: recuentos de aerobios, *E. coli*/coliformes y recuento de hongos y levaduras.



Fuente: (Luca, 2009)

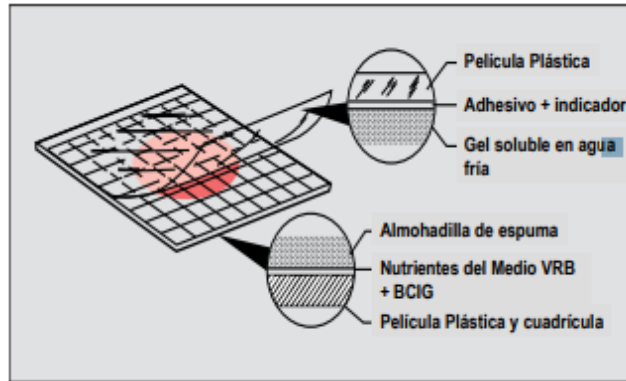
Figura 3: Estructura placa petrifilm

6.3.4.2. Placas 3M™ Petrifilm™ *E. coli*/Coliformes.

Estas placas además de tener los nutrientes de Bilis y Rojo Violeta (VRB) contienen un indicador de actividad de la glucuronidasa, ya que aproximadamente el 97% de las *E. coli* producen beta-glucuronidasa sustancia que reacciona con el indicador (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido) y produce un precipitado azul en las

colonias y un indicador tetrazolio, que facilita la enumeración de las colonias. Las *E. coli* al fermentar la lactosa producen gas, el mismo que queda atrapado con la lámina superior del petrifilm.

Incubación e interpretación: para coliformes: incubar **35– 37°C** por 24h produciendo colonias rojas con gas y para *E. coli*: incubar **35 – 37°C** por 48h colonias azules con gas. (3M 2011).

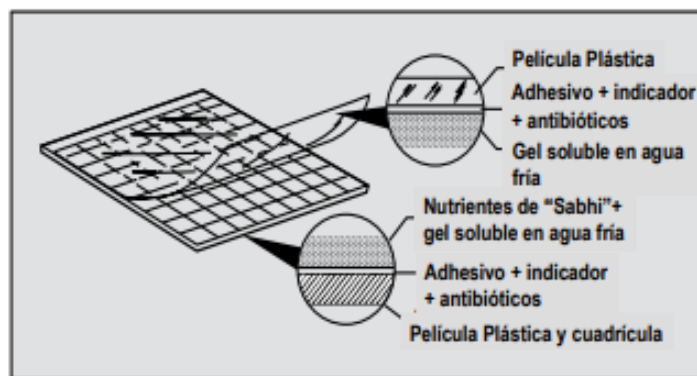


Fuente: (3M 2011).

Figura 4: Estructura placas petrifilm para recuento *E. coli*/Coliformes

6.3.4.3. Placa 3M™ Petrifilm™ Rápida para recuento de Hongos y Levaduras.

La Placa 3M™ Petrifilm™ Rápida para recuento de Hongos y Levaduras contiene nutrientes complementados con dos antibióticos “Sabhi”, (clorotetraciclina y cloramfenicol), un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de fosfatos (BCIP) que facilita el recuento de Hongos y Levaduras. (Seiler, 2011).



Fuente: (3M 2011).

Figura 5: Estructura placas petrifilm para recuento rápido Hongos y Levaduras

6.3.4.3.1. Recuento de Hongos.

Las colonias características: colonias grandes, colonias con bordes difusos, de color verde azulado después de una incubación prolongada, las colonias parecen planas y tienen un centro oscuro con bordes difusos

6.3.4.3.2. Recuento de levaduras

Las colonias características: colonias pequeñas, colonias con bordes definidos, de color canela rosado a verde azulado, las colonias parecen elevadas (tridimensionales) y tienen un color uniforme.

6.3.4.3.3. Crecimiento y formación de la colonia

Para determinar estos factores se debe incubar las Placas 3M Petrifilm Rápidas para recuento de mohos y levaduras a 25-28 °C durante 48 ± 2 horas en posición horizontal, con la parte transparente hacia arriba, en pilas de no más de 40 placas (Seiler, 2011)

6.3.5. Productos farmacéuticos:

6.3.5.1. Enzymed.

6.3.5.2. Composición: Cada tableta recubierta contiene bromoprida 5 mg, pancreatina 400 mg, simeticona 60 mg.

6.3.5.3. Dosificación: Según preinscripción médica.

6.3.5.4. Contraindicaciones y advertencias: Hipersensibilidad a sus componentes, embarazo y lactancia. Puede producir somnolencia por lo tanto debe evitarse conducir vehículos y ejecutar actividades que requieren animo vigilante. Debe evitarse el consumo concomitante de bebidas alcohólicas y en casos de insuficiencia renal severa se recomienda reducir la dosis.

6.3.5.5. Vía de administración: Oral y su venta se hace bajo formula médica. Además, se recomienda mantener fuera del alcance de los niños, así como conservar a temperatura menor de 30°C en su empaque o envase original.

6.3.5.6. Presentación: Enzymed®, foil x4 tabletas recubiertas (Reg. San. INVIMA 2015M-0004192-R1).

6.3.5.7. Descripción: Enzymed® tiene una acción normalizadora de la función digestiva como resultado de la combinación de acción de la Bromoprida que actúa como estimulante de la motilidad gastrointestinal sin afectar la secreción pancreática o biliar, mejorando así el vaciamiento gástrico, aumentando la presión a nivel de los cardias y provocando relajación pilórica, con lo cual se disminuye el reflujo gastroesofágico.

La pancreatina es un principio activo que incluye enzimas pancreáticas que contribuyen con la función digestiva. Asimismo, la simeticona es un antiflatulento que actúa disminuyendo la tensión superficial de las burbujas de gas presentes en la luz del tubo digestivo, provocando su coalescencia en burbujas más grandes que

pueden ser eliminadas con mayor facilidad, aliviando de esta manera los síntomas provocados por el exceso de gases.

6.3.5.8. Indicaciones: El campo terapéutico de Enzymed® comprende trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal, síndrome dispéptico, hernia hiatal, dispepsia gástrica, reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, gastritis, estreñimiento crónico, gastroduodenitis, úlcera péptica, estenosis pilórica funcional, náuseas y vómitos de origen central y/o periférico. Además, por su contenido enzimático, Enzymed® regula la digestión de proteínas, carbohidratos y grasas.

6.3.6. Validación.

Validar es demostrar con un alto grado de confianza por medio de evidencias documentadas que un proceso específico producirá de forma consistente productos que reunirán las características de calidad predefinidas. Este proceso además ofrece evidencias de que un método es capaz de servir para su propósito planeado. (Mosquera Ayala Diego Alejandro, 2012)

6.3.7 Parámetros cuantitativos

6.3.7.1. Precisión.

Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas. Usualmente se expresa en términos de la Desviación Estándar(s). Otra forma de expresar la precisión es la Desviación Estándar Relativa o Coeficiente de Variación (CV), que se calcula: (Belouafa *et al.*, 2017)

$$CV = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

6.3.7.2. Repetibilidad.

Es una medida de la precisión de datos obtenidos por un solo operador trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos). (USA International Accreditation Service, 2015)

6.3.7.3. Reproducibilidad

Es una medida de la precisión de los datos obtenidos entre dos o más analistas y/o laboratorios que utilizan el mismo método y similares condiciones. Para la determinación de la reproducibilidad dentro del laboratorio, algunas de las condiciones variables que se deben considerar incluyen diferentes intervalos de tiempo entre análisis, analistas, lotes o preparaciones de reactivos, instrumentos y diferentes matrices de agua. (USA International Accreditation Service, 2015)

7. METODO

7.1. Tipo de investigación.

El presente estudio, en el cual se realiza una revisión exhaustiva en donde se identifica en función epistemológica y en función del propósito que es de tipo exploratorio, explicativo secuencial, el cual es el conjunto de procesos sistemáticos, empíricos y críticos de investigación que implican recolección, análisis y vinculación de datos cuantitativos y cualitativos. (Hernández, Fernández, & Baptista, 2014)

7.2. Población

En el presente trabajo se realizó un estudio experimental en donde se tuvieron en cuenta los primeros ensayos preliminares de la validación en método convencional (recuento en placa) y métodos rápidos en Placa 3M™ Petrifilm™ para la detección ***Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans*** de forma simultánea en el producto farmacéutico Enzymed del laboratorio **BIOCHEM FARMACÉUTICA DE COLOMBIA, LTDA.**

El estudio se realizó en el laboratorio de análisis microbiológico de la empresa **Laser Pharmaceutica S.A.S** ubicada en calle 168 # 22-35 de la ciudad de Bogotá, con muestras de productos farmacéuticos Enzymed en tabletas recubiertas.

7.3. Muestra.

Se toma 3 muestras de 3 lotes diferentes del producto enzymed, proveniente **BIOCHEM FARMACÉUTICA DE COLOMBIA, LTDA.** La metodología se fundamenta en el Capítulo <61> Examen microbiológico de productos no estériles: <62> Pruebas de microorganismos específicos según lo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF-35 (2017).

Tabla 1: Lotes utilizados en los ensayos preliminares para la validación

NUMERO DE LOTES	
LOTE 1	101117
LOTE 2	111217
LOTE 3	111117

7.4. Microorganismos.

Los microorganismos utilizados para el presente estudio son los establecidos por la USP vigente para demostrar la Aptitud del Método.

Tabla 2: Cepas estandarizadas utilizadas en el producto Enzymed.

MICROORGANISMOS	LOTE	ATCC	Temperatura de Incubación	Tiempo de incubación
<i>Escherichia coli</i>	443-735	8739	30 – 35°C	3 días
<i>Candida albicans</i>	392-708	10231	20 – 25°C	5 – 7 días
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	483-567	16404	20 – 25°C	5 – 7 días

8. METODOLOGIA

Para la ejecución de la metodología, se tuvieron en cuenta las condiciones estipulada por Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF-35 (2017).

8.1. Preparación de las cepas.

Las cepas de pruebas utilizadas están debidamente estandarizadas (*Escherichia coli* ATCC® 8739, *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404 y *Candida albicans* ATCC® 10231) y validadas por la empresa Laser Farmacéutica S.A.S. que corresponde pases 2 (cepa pura).

Para realizar la estandarización del inóculo se toma como referencia la escala Mcfarland $1,5 \times 10^8$ UFC/mL que tiene una absorbancia teórica de 0.104 a 625nm.

A partir de las cepas estandarizadas se toma una muestra representativa y se inoculan en tubos que contengan 9 mL de Caldo Tripticasa de soya (TSB), se hace vortex para la homogenización completa del inóculo, se procede a tomar absorbancia 0,070 a 625nm: Se toma 1mL y se hacen diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6})

Para medir la absorbancia de la cepa *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404, se toma una cantidad específica de perlas de vidrio y se suspende en la caja de Petri para hacer fricción y romper las hifas y liberar las esporas.

8.2. Promoción de crecimiento.

A partir de los microorganismos utilizados *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, Se toma 1mL de la dilución 10^{-6} y se siembra por profundidad, utilizando los medios MacConkey, Tripticasa de soya y sabouraud. Esto se hace para garantizar que el medio cumpla con los requerimientos nutricionales para que se desarrolle.

Tabla 3: Promoción de crecimiento *Escherichia coli*.

MEDIO DE CULTIVO	PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO	INHIBICIÓN	TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACION
Preparación de cepa de prueba: Caldo tripticasa de soja Medio de cultivo específico. Agar MacConkey.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	32.5 ± 2.5° 18-24 Horas.

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF-35 (2017) <62

Tabla 4: Promoción de crecimiento *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*

MEDIO DE CULTIVO	PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO	INHIBICIÓN	TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACION
Preparación de cepa de prueba: Caldo tripticasa de soja Medio de cultivo específico. Agar Sabouraud.	<i>Aspergillus brasiliensis</i> <i>Candida albicans</i>	N.A	22.5 ± 2.5° 3-7 Días.

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF-35 (2017) <62>

8.3. Prueba de Presencia/Ausencia.

Para la prueba de Presencia/Ausencia se utilizó como microorganismo específico *Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans*

- Presencia: Crecimiento del microorganismo de interés con las características para cada medio de cultivo.
- Ausencia: No se observa crecimiento, o no se observa crecimiento del microorganismo con las características para cada medio.

Características macroscópicas.

- *Escherichia coli*: Colonias rosadas o rojas
- *Aspergillus brasiliensis*: Color negro con aspecto polvoso, opaca de bordes irregulares.
- *Candida albicans* Colonias lisas, brillantes, de color blanco con presencia de filamentos que se encuentra sumergidos en el agar.

8.4 Evaluación del producto Enzymed en TSB+Tween VS TSB.

- Se pesaron 10g del producto enzymed tabletas recubiertas en 90 ml de Caldo Tripticasa de soja (TSB +Tween 80 (1ml por cada litro) y Caldo Tripticasa de

soya (TSB), adicionalmente se realizan diluciones hasta (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) para cada cepa, A partir de las diluciones 10^{-5} se inocula 1mL en cada dilución realizada.

- Para evaluar el porcentaje de recuperación del inóculo, se sembraron por triplicado en cajas Petri y placas petrifilm por cada una de las diluciones realizadas para el producto.
- Se realizaron controles para cada cepa a partir de la dilución 10^{-6}

8.5. Preparación de la muestra.

- De forma aséptica se enciende la cabina de flujo laminar de 5 a 10 minutos, limpiar con alcohol la cabina y la balanza.
- Para el análisis del producto Enzymed de cada lote (Lote 1, Lote 2 y Lote 3), se toma de cada lote 3 muestras, se pesan 10g y se agregaran en frasco schott con 90mL Caldo Trypticasa de soya (TSB), se realiza diluciones hasta 10^{-2} en tubos que contengan Caldo Trypticasa de soya (TSB). La dilución de trabajo es la concentración de 10^{-2} del producto.
- Se tomó 1 mL de la concentración de cada cepa a evaluar con una concentración < 100 UFC.
- A partir del Lote 1 se llevó a cabo los ensayos preliminares para la validación de los parámetros estadísticos.

8.6. precisión intermedia

La precisión intermedia se llevó a cabo dentro del laboratorio a partir de la concentración del inóculo 10^{-6} , por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea. Esto se realizó en el fin de verificar para la variabilidad entre los resultados una serie de análisis sobre la misma muestra.

8.7. Métodos Estadísticos

Para llevar a cabo la aptitud del método en placas petrifilm y convencionales para la detección de *Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans* se determina los siguientes parámetros cuantitativos:

- Precisión
- Repetibilidad
- Reproducibilidad

8.7.1. Precisión

EL procedimiento analítico se determinó mediante el análisis de un numero se muestras suficientes de alícuotas de una muestra homogéneo. Donde se utilizaron 9 réplicas.

8.7.2. Repetibilidad

La repetibilidad se llevó a cabo en condiciones de un mismo analista, con el mismo equipo, donde se trabaja 9 réplicas utilizando la misma muestra homogénea el mismo día.

8.7.3. Reproducibilidad

Este método se llevó a cabo en condiciones de diferentes analistas diferentes días, equipos diferentes, utilizando las mismas condiciones de laboratorio y 9 replicas

Estos parámetros estadísticos se calcularon estadísticamente hallando la media, desviación estándar SD, coeficiente de variación (RSD), para garantizar la certeza y la confiabilidad de los resultados.

8.8. Análisis microbiológico convencional.

8.8.1 Recuento *Escherichia coli*

Se toma 1mL de la dilución 10^{-2} (dilución del producto/concentración conocida de la cepa), se transfiere por triplicado, alícuotas de 1 ml de la dilución 10^{-2} en cajas de Petri estériles. Se vierte en las cajas de Petri, 15 a 25mL de Agar MacConkey fundido a una temperatura de 38°C , se mezcla el inóculo con el medio fundido dando movimientos de vaivén.

Una vez solidificado el medio de cultivo se invierte las placas y se incuban a una temperatura de $30\text{-}35^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 18 a 24 horas. Pasado este tiempo se realiza el recuento teniendo en cuenta que el porcentaje de recuperación sea $>$ al 70 % comparado con del control inicial.

8.8.2. Recuento Hongos y Levaduras

Se toma 1mL de la dilución 10^{-2} (dilución del producto/concentración conocida de la cepa). Se transfiere por triplicado, alícuotas de 1 ml de la dilución 10^{-2} en cajas de Petri estériles. Se vierte en las cajas de Petri, 15 a 25ml de Agar sabouraud Dextrosa fundido a una temperatura de 38°C , se mezcla el con el medio fundido dando movimientos de vaivén.

Una vez se solidifica el medio de cultivo se invierte las placas y se incuban a una temperatura de 20°C a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 5-7 días. Pasado este tiempo se realiza el recuento teniendo en cuenta que el porcentaje de recuperación sea $>$ al 70 % comparado con el control inicial.

8.9. Recuento microbiológico rápido.

8.9.1. Placas 3M™ Petrifilm para el Recuento de *E. coli*/coliformes

Se disponen las Placas 3M™ Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/coliformes, en una superficie plana y nivelada. Se levanta la película superior. Con ayuda de la micro pipeta en una posición perpendicular a la Placa Petrifilm, se coloca 1 mL de la dilución 10^{-2} (dilución del producto/concentración conocida de la cepa) en el centro de la película inferior. Bajar cuidadosamente la película superior para evitar formación de burbujas de aire. Colocar el dispersor en la película superior sobre él y presionar suavemente el dispersor para distribuir el sobre el área circular. Incubar las placas boca arriba en grupos de no más de 20 placas, tiempo de incubación $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ y la temperatura $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para *E. coli* (Souza *et al.*, 2015)

8.9.2. Placas 3M™ Petrifilm para el Recuento de Hongos y Levaduras.

Se disponen las Placas 3M™ Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/coliformes, en una superficie plana y nivelada. Se levanta la película superior. Con ayuda de la micro pipeta en una posición perpendicular a la Placa Petrifilm, se coloca 1 mL de la dilución 10^{-2} (dilución del producto/concentración conocida de la cepa) en el centro de la película inferior. Bajar cuidadosamente la película superior para evitar formación de burbujas de aire. Colocar dispersor en la película superior sobre él y presionar suavemente el dispersor para distribuir el sobre el área circular, Incubar las placas boca arriba en grupos de no más de 20 placas, tiempo de incubación 25°C - 28°C durante 48 ± 2 horas.

10. Análisis de costo beneficio (CBA)

Para el análisis costo-beneficio (CBA) se procede hacer un paralelo entre las dos técnicas (técnicas convencionales y técnicas rápidas) tanto económicamente como en cuestiones de tiempo.

11. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Tabla 5: Cronograma de actividades a ser desarrolladas en la ejecución del proyecto

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																									
AP ACTIVIDADES PROGRAMADAS				ANE ACTIVIDADES NO PROGRAMADAS				AE ACTIVIDADES EJECUTADAS				AR ACTIVIDADES REPROGRAMADAS													
ACTIVIDADES	MESES	FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO							
		semanas				semanas				Semanas				semana				semanas							
	SEMANAS				1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
	AP	AP	AP	A P	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	
Elección del problema a investigar; observación y análisis																									
Revisión bibliográfica y estructuración del anteproyecto																									
Estandarización del validado por la empresa Laser Farmacéutica S.A.S.																									
Determinación de los parámetros estadísticos																									
Lectura de los resultados obtenidos																									
Análisis de resultados, realización de informe preliminar, correcciones y entrega de informe final																									
Preparación y sustentación final del proyecto.																									

Tabla 6: Cronograma de actividades desarrolladas en la empresa Laser Pharmaceutica para el control de calidad

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																					
ACTIVIDADES	MESES	FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO			
		semanas				semanas				semanas				semana				semanas			
	SEMANAS		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
Entrenamiento de desactivación de material, lavado y esterilización.																					
Diligenciamiento de formatos: Temperatura y Húmeda relativa, diferenciales de presión, ambientes																					
Preparación de medios de cultivos: para análisis de rutina del laboratorio, Validaciones y esterilidad.																					
Análisis microbiológicos para muestras veterinarias, cosméticas, antibióticos y análisis de agua.																					
Diligenciamiento de formato de áreas: siembra de antibióticos, siembra no estériles, incubación y lectura,																					
Lecturas de análisis: Aerobios Mesofilos, Hongos y Levaduras, patógenos																					
Liberar resultados de análisis de la muestra.																					

12. RESULTADOS Y DISCUSION.

En este estudio se realizó la aptitud del método establecida por la USP 40 NF-35 (2017) <1223> con el fin de verificar si la técnica es confiable para el análisis microbiológico del producto Enzymed tabletas elaborado por **Biochem Farmacéutica de Colombia, Ltda.**, utilizando técnica convencionales y placas petrifilm para el recuento rápido de *E. coli*, Hongos y Levadura, el cual se establecieron parámetros analíticos, para determinar las condiciones y variaciones del laboratorio de los diferentes equipos con diferentes analistas, donde se expresa una precisión intermedia dentro del laboratorio, seguido de esto se llevó a cabo la precisión donde se demuestra el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimientos repetidamente a una misma muestra. La precisión del método fue medida en dos partes: reproducibilidad y repetibilidad donde se calculó el promedio, desviación estándar (DS), coeficiente de variación (RSD) donde fueron comparadas con la tabla de t-Student y hallando el porcentaje de recuperación, para dar cumplimiento a la USP vigente según lo estipulado.

Para determinar si los parámetros estadísticos son precisos, repetible y reproducibles se tuvieron en cuenta la desviación estándar (DS < 2%) y el coeficiente de variación (RSD < 10%).

También se utilizaron cepas certificadas ATCC®, pase 2 para garantizar la viabilidad y pureza, de las cuales se utilizaron en el laboratorio ***Escherichia coli***, ***Candida albicans***, ***Aspergillus brasiliensis*** para poner a prueba los parámetros estadísticos por método convencional, placas Petrifilm de *E. coli*/Coliformes, Hongos y Levaduras.

Para garantizar la validez y confiabilidad de los resultados obtenidos, previamente se enciende la cabina de flujo laminar de 5 a 10 para circulación y purificación del aire, además se usó protección personal para evitar contaminaciones de la muestra y del ambiente

12.1. Resultados promoción y crecimiento.

Tabla 7: Promoción y crecimiento

MEDIOS	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida Albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
MacConkey	Cumple	Cumple	Cumple
Tripticasa de soya	Cumple	Cumple	Cumple
Sabouraud	Cumple	Cumple	Cumple

Los resultados obtenidos de la prueba de promoción de crecimiento realizada en cada medio de cultivo preparado, nos garantiza que el medio utilizado en la prueba contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos

evaluados logrando el crecimiento óptimo, observando así características de crecimiento macroscópicas de las colonias en cada uno de los medios evaluados.

la prueba de promoción de crecimiento en los medios MacConkey, Tripticasa de soya y Sabouraud, se evidencio la capacidad del medio para cumplir con todas las exigencias nutricionales. Cada medio deshidratado debe de cumplir con los requerimientos nutricionales para promover el crecimiento de los microorganismos.

12.2. Resultados Prueba de Presencia/Ausencia

Tabla 8: Presencia/ausencia de *E.coli*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*

LOTES	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida Albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
LOTE 1 Muestra 1	(+)	(+)	(+)
LOTE 1 Muestra 2	(+)	(+)	(+)
LOTE 1 Muestra 3	(+)	(+)	(+)
LOTE 2 Muestra 1	(+)	(+)	(+)
LOTE 2 Muestra 2	(+)	(+)	(+)
LOTE 2 Muestra 3	(+)	(+)	(+)
LOTE 3 Muestra 1	(+)	(+)	(+)
LOTE 3 Muestra 2	(+)	(+)	(+)
LOTE 3 Muestra 3	(+)	(+)	(+)

La tabla 8 muestra el análisis cualitativo de detección del microorganismo con medio selectivo demostró presencia en el producto Enzymed tabletas. Mostrando Crecimiento del microorganismo de interés con las características para cada medio de cultivo.

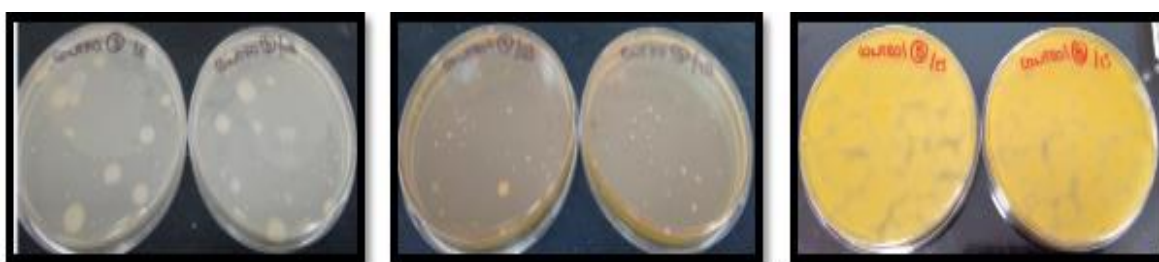
- ***Escherichia coli*:** Colonias rosadas o rojas
- ***Aspergillus brasiliensis*:** Color negro con aspecto polvoso, opaca de bordes irregulares.
- ***Candida albicans*** Colonias lisas, brillantes, de color blanco con presencia de filamentos que se encuentra sumergidos en el agar.

12.3. Ensayos preliminares evaluando del producto Enzymed en TSB+TWEEN vs TSB.

Tabla 9: Concentración del inóculo método convencional

MÉTODO CONVENCIONAL									
Fecha de siembra: 17-05-18		Fecha de lect bac: 18-05-18			Fecha de lect HyL: 19-05-18				
Microorganismos	Absorbancia		Promedio	Concentración teórica	Rto 1	Rto 2	Rto 3	Promedio	%RECUP
<i>Escherichia coli</i>	0,074	0,075	0,075	108	124	105	84	104	96,605
<i>Candida albicans</i>	0,060	0,062	0,061	87	70	75	73	73	83,525
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,072	0,075	0,074	102	103	100	114	106	103,595

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP), lectura de bacterias (lect bac) y lectura de Hongos y Levaduras (lect HyL)



Escherichia coli

Candida albicans

Aspergillus brasiliensis

Fuente:(Medina D,2018)

Figura 3: Control cepas método convencional

Tabla 10: Concentración del inóculo en Placas Petrifilm

MÉTODO PETRIFILM								
Fecha de siembra: 17-05-18		Fecha de lectura bac: 18-05-18			Fecha de lect HyL: 19-05-18			
Microorganismos	Absorbancia		Promedio	Concentración teórica	Rto 1	Rto 2	Promedio	%RECUP
<i>Escherichia coli</i>	0,074	0,075	0,075	108	87	68	78	71,76
<i>Candida albicans</i>	0,060	0,062	0,061	87	68	60	64	73,56
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,072	0,070	0,071	102	90	98	94	92,16

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP), lectura de bacterias (lect bac) y lectura de Hongos y Levaduras (lect HyL)



Escherichia coli

Candida albicans

Aspergillus brasiliensis

Fuente: (Medina D,2018)

Figura 3: Control cepas método convencional

Tabla 11: Resultados evaluación del producto Enzymed tabletas +TSB + Tween 80 al 1% en método convencional.

METODO CONVENCIONAL TSB + Tween															
Microorganismos	Dilución 10 ⁻¹					Dilución 10 ⁻²					Dilución 10 ⁻³				
	Rto 1	Rto 2	Rto 3	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Rto 3	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Rto 3	Promedio	%RECUP
<i>Escherichia coli</i>	24	31	35	30	28,75	35	37	38	37	35,14	32	35	30	33	30,09
<i>Candida albicans</i>	73	85	76	78	107,34	81	83	87	84	115,14	68	70	70	70	80,46
<i>Aspergillus. Brasiliensis</i>	63	54	47	55	51,74	81	83	87	84	79,18	60	60	49	55	53,43

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP).

Tabla 12: Resultados evaluación del producto Enzymed tabletas +TSB + Tween 80 1% en Placas Petrifilm.

PLACAS PETRIFILM TSB + Tween													
Microorganismos	Dilución 10-1				Dilución 10-2				Dilución 10-3				
	Rto 1	Rto 2	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Promedio	%RECUP	
<i>Escherichia coli</i>	20	19	20	18,06	25	26	26	23,61	27	26	27	24,54	
<i>Candida albicans</i>	34	34	34	39,08	39	48	44	67,97	28	32	43	66,65	
<i>Aspergillus. brasiliensis</i>	60	65	63	61,27	82	84	83	81,37	84	99	88	86,40	

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP).

Tabla 13: Resultados evaluación del producto Enzymed Tabletas + TSB en método convencional.

METODO CONVENCIONAL TSB															
Microorganismos	Dilución 10 ⁻¹					Dilución 10 ⁻²					Dilución 10 ⁻³				
	Rto 1	Rto 2	Rto 3	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Rto 3	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Rto 3	Promedio	%RECUP
<i>Escherichia coli</i>	77	70	75	74	68,519	83	81	80	81	75,309	86	83	81	82	75,926
<i>Candida albicans</i>	72	58	75	68	78,54	73	70	72	72	82,38	65	73	72	73	83,333
<i>Aspergillus. Brasiliensis</i>	78	76	77	77	75,49	82	86	80	83	81,05	63	60	65	63	61,275

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP).

Tabla 14: Resultados evaluación del producto Enzymed Tabletas + TSB en Placas Petrifilm.

PLACAS PETRIFILM TSB												
Microorganismos	Dilución 10 ⁻¹				Dilución 10 ⁻²				Dilución 10 ⁻³			
	Rto 1	Rto 2	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Promedio	%RECUP	Rto 1	Rto 2	Promedio	%RECUP
<i>Escherichia coli</i>	71	53	62	80,00	56	56	64	82,58	62	65	70	90,14
<i>Candida albicans</i>	30	24	27	42,19	40	40	40	62,50	38	29	43	67,45
<i>Aspergillus. brasiliensis</i>	78	58	68	72,34	133	132	133	140,96	101	94	112	119,13

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP).

La tabla 8 muestran las concentraciones teóricas del inóculo a partir de las absorbancias obtenidas para cada uno del microorganismo a evaluar y el porcentaje de recuperación mayor al 70%. Teniendo en cuentas que este método se llevó a cabo en placas Petri y placas petrifilm.

La evaluación del TSB+Tween 80 al 1%+ producto y TSB+ producto, se llevó a cabo con el fin de evaluar la dilución de trabajo y si era necesario neutralizar el principio activo del producto Enzymed tableta. Según los resultados obtenidos se puede observar que en la dilución 10⁻² TSB+producto hay un comportamiento homogéneo y lógico de acuerdo con las diluciones seriadas realizadas del producto, esto se puede corroborar en la Tabla 11 y 12 que muestra que el porcentaje de recuperación del inóculo es mayor al 70% lo cual cumple con las especificaciones estipuladas en la USP vigente. Es importante analizar que para el método convencional y placas petrifilm los resultados son muy cercanos y comparables.

Es de anotar que hay factores, que interfieren en el crecimiento microbiano, como factores humanos, como lo son facilidad y manejo de la micropipeta, teniendo en cuenta que las diluciones realizadas del producto hasta 10⁻³, aumenta el porcentaje de recuperación.

Asimismo, la media de cada uno de los Analistas (I y II) no muestran diferencias significativas, lo cual nos indica que se obtuvo una buena precisión del método.

12.4. precisión intermedia

12.4.1 Recuento Control Cepas

Tabla 15: Concentración del inóculo Método Convencional.

MÉTODO CONVENCIONAL								
Fecha de siembra: 18-05-18			Fecha de lectura bac: 19-05-18				Fecha de lect HyL: 21-05-18	
Microorganismos	Absorbancia		Promedio	Concentración teórica	Rto 1	Rto 2	Promedio	% RECUP
<i>Escherichia coli</i>	0,071	0,070	0,071	102	98	92	95	93,14
<i>Candida albicans</i>	0,069	0,070	0,070	102	91	85	88	86,27
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,076	0,073	0,075	108	110	116	113	104,63

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP), lectura de bacterias (lect bac) y lectura de Hongos y Levaduras (lect HyL)

Tabla 16: Concentración del inóculo Método Petrifilm

MÉTODO PETRIFILM								
Fecha de siembra: 18-05-18			Fecha de lectura bac: 19-05-18			Fecha de lect HyL: 21-05-18		
Microorganismo	Absorbancia		Promedio	Concentración teórica	Rto 1	Rto 2	Promedio	% RECUP
<i>Escherichia coli</i>	0,071	0,070	0,071	102	59	60	59,5	58,33
<i>Candida albicans</i>	0,069	0,070	0,070	102	65	68	66,5	65,20
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,076	0,073	0,075	108	96	91	93,5	91,67

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP), lectura de bacterias (lect bac) y lectura de Hongos y Levaduras (lect HyL)

La precisión intermedia se tomó como referencia la concentración del inóculo inicial 10^{-6} . Esto se realizó en el fin de verificar la variabilidad entre los resultados una serie de análisis repetitivos utilizando dos métodos con la misma metodología, diferentes analistas, diferentes equipos bajo las mismas condiciones ambientales del laboratorio en una misma muestra homogénea. Observando que el método es preciso y repetible según con los valores obtenido.

12.4.2 Presión intermedia en método convencional y placas petrifilm

En la tabla 17 y 18, se observan los resultados expresados en unidades logarítmicas, para el ensayo de precisión, los cuales se obtuvieron realizando 9 repeticiones, por cada microorganismo evaluado

Tabla 17: Precisión intermedia de microorganismos estandarizados.

MÉTODO CONVENCIONAL												
n	<i>Escherichia coli</i> Ana I	<i>Escherichia coli</i> Ana I LOG	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Escherichia coli</i> Ana II LOG	<i>Candida albicans</i> Ana I	<i>Candida albicans</i> Ana I LOG	<i>Candida albicans</i> Ana II	<i>Candida albicans</i> Ana II LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II LOG
1	65	1,813	69	1,839	74	1,869	77	1,886	131	2,117	128	2,107
2	60	1,778	70	1,845	73	1,863	76	1,881	114	2,057	130	2,114
3	60	1,778	62	1,792	70	1,845	74	1,869	136	2,134	120	2,079
4	69	1,839	62	1,792	82	1,914	78	1,892	125	2,097	129	2,111
5	66	1,820	59	1,771	75	1,875	73	1,863	131	2,117	129	2,111
6	59	1,771	61	1,785	63	1,799	80	1,903	128	2,107	128	2,107
7	62	1,792	63	1,799	79	1,898	68	1,833	141	2,149	110	2,041
8	67	1,826	69	1,839	76	1,881	73	1,863	120	2,079	111	2,045
9	63	1,799	60	1,778	79	1,898	69	1,839	133	2,124	112	2,049
Promedio	63	1,802	64	1,805	75	1,872	74	1,868	110	2,041	110	2,041
DS	3,504	0,545	4,256	0,629	5,637	0,751	3,993	0,601	8,212	0,914	8,681	0,939
RSD	5,523	0,742	6,661	0,824	7,561	0,879	5,405	0,733	7,466	0,873	7,892	0,897

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

Tabla 18: Precisión intermedia de microorganismos estandarizados.

PLACAS PETRIFILM												
n	<i>Escherichia coli</i> Ana I	<i>Escherichia coli</i> Ana I LOG	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Escherichia coli</i> Ana II LOG	<i>Candida albicans</i> Ana I	<i>Candida albicans</i> Ana I LOG	<i>Candida albicans</i> Ana II	<i>Candida albicans</i> Ana II LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II LOG
1	46	1,663	47	1,672	74	1,869	77	1,886	128	2,107	130	2,114
2	47	1,672	46	1,663	73	1,863	76	1,881	140	2,146	140	2,146
3	38	1,580	46	1,663	70	1,845	74	1,869	142	2,152	145	2,161
4	44	1,643	49	1,690	72	1,857	78	1,892	124	2,093	142	2,152
5	46	1,663	45	1,653	75	1,875	73	1,863	126	2,100	145	2,161
6	40	1,602	53	1,724	66	1,820	80	1,903	115	2,061	150	2,176
7	39	1,591	42	1,623	79	1,898	76	1,881	121	2,083	120	2,079
8	48	1,681	43	1,633	76	1,881	73	1,863	120	2,079	146	2,164
9	46	1,663	47	1,672	79	1,898	79	1,898	126	2,100	147	2,167
Promedio	44	1,641	46	1,667	74	1,868	76	1,882	110	2,041	110	2,041
DS	3,768	0,576	3,245	0,511	4,177	0,621	2,539	0,405	8,908	0,950	9,593	0,982
RSD	8,606	0,935	6,986	0,844	5,661	0,753	3,335	0,523	8,099	0,908	8,721	0,941

La precisión intermedia se evaluó mediante la realización del análisis en días diferentes se evaluó mediante el ensayo de nueve réplicas y bajo las mismas condiciones experimentales. La precisión se expresó mediante la desviación estándar (DS< 2%) y coeficiente de variación (RSD<10%) donde se muestra el Criterio de aceptación.

La precisión intermedia nos muestra los datos donde se mide el grado de concordancia entre los resultados obtenidos de las mediciones repetidas, utilizando diferentes microorganismos en una misma muestra y en condiciones óptimas del laboratorio, mostrando un porcentaje de recuperación en las dos técnicas, recuento en placa y recuento en Petrifilm.

Las tablas 17 y 18 muestra que los resultados del método convencional y placas Petrifilm en unidades logarítmicas para el ensayo de precisión intermedia, muestra que la desviación estándar utilizando en cada uno del recuento en unidades logarítmicas del microorganismo se encuentran valores relativamente pequeños indicando que existe una agrupación de datos cercanos a la media. corroborando lo expuesto por diferentes análisis, a lo largo de un plazo prolongado, dentro del mismo laboratorio. (Anderson, 2010). Los resultados obtenidos, analizando en las tablas 17 y 18 nos muestra que tan lejos están del valor real bajo varias condiciones en el laboratorio utilizando la misma muestra homogénea, así: La desviación estándar que se muestran en las tablas señala valores pequeños, no mayor al 2% dejando claro que no se observa una diferencia significativa entre los valores obtenidos en la prueba; siendo, este, un método preciso. Además, el coeficiente de variación (CV) en cada una de la muestras que lo datos para la precisión intermedia, no fue mayor al 10% mostrando que el método cumple con lo establecidos por la USP 40 NF-35 (2017) <1226> en la precisión del método. También, el método convencional y placas Petrifilm utilizado para la recuperación de microorganismos es preciso, debido que el DS es inferior a 2% y el RSD es menor al 10%

Tabla 19: Resultados Medio Selectivo y Placas Petrifilm.

MÉTODO CONVENCIONAL (Agar MacConkey)					MÉTODO PETRIFILM				
n	<i>Escherichia coli</i> Ana I	<i>Escherichia coli</i> Ana I LOG	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Escherichia coli</i> Ana II LOG	n	<i>Escherichia coli</i> Ana I	<i>Escherichia coli</i> Ana I LOG	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Escherichia coli</i> Ana II LOG
1	60	1,778	59	1,771	1	46	1,663	47	1,672
2	59	1,771	58	1,763	2	43	1,633	47	1,672
3	63	1,799	49	1,690	3	48	1,681	46	1,663
4	67	1,826	56	1,748	4	39	1,591	49	1,690
5	63	1,799	57	1,756	5	44	1,643	46	1,663
6	58	1,763	53	1,724	6	40	1,602	45	1,653
7	59	1,771	60	1,778	7	39	1,591	50	1,699
8	63	1,799	65	1,813	8	43	1,633	42	1,623
9	62	1,792	65	1,813	9	46	1,663	46	1,663
Promedio	62	1,789	58	1,763	Promedio	43	1,635	46	1,667
DS	2,833	0,452	5,172	0,714	DS	3,257	0,513	2,297	0,361
RSD	4,603	0,663	52,019	1,716	RSD	7,556	0,878	4,946	0,694

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

Se puede evidenciar en los resultados obtenidos el comportamiento comparativo de los dos métodos utilizados, dando confiabilidad y homogeneidad de los datos. Podemos decir, entonces, que el método es preciso, debido que el DS es menor a 2% y el RSD es menor al 10%. Por otro lado, la prueba de Aptitud del método para recuperación de *E. coli* en agar MacConkey cumplen los criterios de aceptación evaluados en cada producto, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos.

En agar MacConkey se observaron colonias de color rojo por la fermentación de la lactosa la cual baja el pH del medio precipitando las sales biliares, las cuales se identificaron por un halo rosado difuso alrededor de la colonia.

Al obtener estos resultados, indica que las pruebas de aptitud del método que se realiza para el recuento microbiológico es la apropiada para la recuperación de *Escherichia coli*.

12.5. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS EVALUADOS

12.5.1 Precisión

A continuación, se muestran los resultados obtenidos expresados en unidades logarítmicas de los ensayos estadístico de (9 repeticiones) realizado por cada uno de los microorganismos.

Tabla 20: Concentración del inóculo en método convencional.

MÉTODO CONVENCIONAL								
Fecha de siembra: 25-05-18			Fecha de lectura bac: 26-05-18			Fecha de lect HyL: 28-05-18		
Microorganismo	Absorbancia		Promedio	Concentración teórica	Rto 1	Rto 2	Promedio	% RECUP
<i>Escherichia coli</i>	0,073	0,075	0,074	108	87	86	86,5	80,09
<i>Candida albicans</i>	0,069	0,070	0,070	102	78	79	79	76,96
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,089	0,088	0,089	128	111	110	111	86,33

Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP), lectura de bacterias (lect bac) y lectura de Hongos y Levaduras (lect HyL)

Tabla 21: Concentración del inóculo en Método Petrifilm.

MÉTODO PETRIFILM								
Fecha de siembra: 25-05-18			Fecha de lectura bac: 26-05-18		Fecha de lect HyL: 28-05-18			
MICROORGANISMO	Absorbancia		Promedio	Concentración teórica	Rto 1	Rto 2	Promedio	% RECUP
<i>Escherichia coli</i>	0,073	0,075	0,074	108	53	55	49,55	45,88
<i>Candida albicans</i>	0,069	0,070	0,070	102	94	94	84,68	83,02
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,089	0,088	0,089	128	111	109	98,20	76,72

Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP), lectura de bacterias (lect bac) y lectura de Hongos y Levaduras (lect HyL)

Seguidamente, se pueden observar los resultados generados mediante los ensayos de precisión con 9 repeticiones; expresados en unidades logarítmicas; utilizando cada microorganismo evaluado, en el producto Enzymed Tabletas.

Tabla 22: Precisión de microorganismos estandarizados en presencia de producto.

MÉTODO CONVENCIONAL						
n	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Escherichia coli</i> Ana II LOG	<i>Candida albicans</i> Ana II	<i>Candida albicans</i> Ana II LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II LOG
1	86	1,934	69	1,839	112	2,049
2	83	1,919	67	1,826	114	2,057
3	84	1,924	64	1,806	120	2,079
4	82	1,914	67	1,826	125	2,097
5	80	1,903	67	1,826	122	2,086
6	90	1,954	68	1,833	128	2,107
7	78	1,892	69	1,839	115	2,061
8	79	1,898	67	1,826	117	2,068
9	86	1,934	69	1,839	111	2,045
Promedio	83	1,920	67	1,826	110	2,041
DS	3,855	0,586	1,590	0,201	5,911	0,772
RSD	4,638	0,666	2,373	0,375	5,374	0,730

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

Tabla 23: Precisión de microorganismo estandarizado en presencia del producto

MÉTODO PETRIFILM						
n	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Escherichia coli</i> Ana II LOG	<i>Candida albicans</i> Ana II	<i>Candida albicans</i> Ana II LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II LOG
1	46	1,663	65	1,813	120	2,079
2	50	1,699	65	1,813	128	2,107
3	55	1,740	63	1,799	120	2,079
4	44	1,643	63	1,799	119	2,076
5	41	1,613	62	1,792	120	2,079
6	42	1,623	61	1,785	128	2,107
7	43	1,633	68	1,833	114	2,057
8	40	1,602	69	1,839	120	2,079
9	44	1,643	63	1,799	120	2,079
Promedio	45	1,651	64	1,808	122	2,086
DS	4,770	0,678	2,693	0,430	4,416	0,645
RSD	10,599	0,131	4,185	0,622	3,620	0,559

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

12.5.2. Repetibilidad.

A continuación, se observan los resultados expresados en unidades logarítmicas, obtenidos en el análisis de repetibilidad, en el producto Enzymed Tabletas realizado por el analista II.

Tabla 24: Repetibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (analista II).

MÉTODO CONVENCIONAL					
n	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Candida albicans</i> Ana II	<i>Candida albicans</i> Ana II LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II LOG
1	86	66	1,820	90	1,954
2	88	60	1,778	91	1,959
3	87	65	1,813	93	1,968
4	87	67	1,826	95	1,978
5	82	65	1,813	92	1,964
6	80	63	1,799	95	1,978
7	85	67	1,826	90	1,954
8	85	68	1,833	97	1,987
9	85	63	1,799	96	1,982
Promedio	85	63	1,799	94	1,973
DS	2,550	2,522	0,402	2,635	0,421
RSD	2,999	4,003	0,602	2,803	0,448

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

Tabla 25: Repetibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (Analista II).

MÉTODO PETRIFILM						
n	<i>Escherichia coli</i> Ana II	<i>Escherichia coli</i> Ana II LOG	<i>Candida albicans</i> Ana II	<i>Candida albicans</i> Ana II LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana II LOG
1	39	1,591	65	1,813	99	1,996
2	45	1,653	62	1,792	92	1,964
3	46	1,663	62	1,792	96	1,982
4	49	1,690	65	1,813	86	1,934
5	40	1,602	60	1,778	84	1,924
6	44	1,643	64	1,806	93	1,968
7	43	1,633	67	1,826	97	1,987
8	42	1,623	63	1,799	94	1,973
9	44	1,643	65	1,813	98	1,991
Promedio	44	1,639	62	1,792	98	1,991
DS	3,046	0,484	2,121	0,327	5,215	0,717
RSD	6,993	0,845	3,421	0,534	5,321	0,726

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

12.2.2. Reproducibilidad

A continuación, se observan los resultados de los microorganismos evaluados y validados, en presencia del producto, obtenidos por el analista 1. Este se realizó en un día diferente al de las pruebas estadísticas anteriormente descritas.

Tabla 26: Reproducibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (Analista 1)

MÉTODO CONVENCIONAL						
n	<i>Escherichia coli</i> Ana I	<i>Escherichia coli</i> Ana I LOG	<i>Candida albicans</i> Ana I	<i>Candida albicans</i> Ana I LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I LOG
1	80	1,903	68	1,833	99	1,996
2	92	1,964	67	1,826	94	1,973
3	82	1,914	69	1,839	92	1,964
4	87	1,940	66	1,820	90	1,954
5	67	1,826	65	1,813	99	1,996
6	84	1,924	68	1,833	98	1,991
7	82	1,914	69	1,839	97	1,987
8	83	1,919	67	1,826	99	1,996
9	85	1,929	62	1,792	93	1,968
Promedio	82	1,916	63	1,799	96	1,982
DS	6,766	0,830	2,224	0,347	3,464	0,540
RSD	8,207	0,914	3,530	0,548	3,608	0,557

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

Tabla 27: Reproducibilidad de los microorganismos estandarizados en presencia de producto (Analista 1)

MÉTODO PETRIFILM						
n	<i>Escherichia coli</i> Ana I	<i>Escherichia coli</i> Ana I LOG	<i>Candida albicans</i> Ana I	<i>Candida albicans</i> Ana I LOG	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Ana I LOG
1	40	1,602	63	1,799	95	1,978
2	44	1,643	65	1,813	99	1,996
3	43	1,633	67	1,826	97	1,987
4	40	1,602	66	1,820	99	1,996
5	43	1,633	64	1,806	96	1,982
6	42	1,623	67	1,826	98	1,991
7	44	1,643	62	1,792	99	1,996
8	46	1,663	65	1,813	94	1,973
9	42	1,623	62	1,792	91	1,959
Promedio	43	1,630	63	1,799	96	1,984
DS	1,936	0,287	1,944	0,289	2,744	0,438
RSD	4,539	0,657	3,085	0,489	2,845	0,454

*Siglas: Logaritmo (LOG), Analista (Ana I II), Desviación estándar (DS<2%) y Coeficiente de Variación (RSD<10%).

La precisión, repetibilidad y reproducibilidad se evaluó utilizando cepas de referencia inoculados en caldo TSB con el producto Enzymed.

Se evaluó la precisión por medio de: La repetibilidad, que es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones cuando el mismo analista analiza muestras homogéneas el mismo día y con el mismo equipo. La reproducibilidad, que es la precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, equipos y días distintos con la misma muestra homogénea; La precisión, que normalmente se mide en términos de coeficiente de variación o desviación típica relativa de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparados independientemente.

La desviación estándar obtenida en cada uno de los parámetros analíticos nos muestra la medida del grado de dispersión de los datos del valor promedio. Los valores mayores al 2% de la desviación estándar nos indican que los datos están lejos de la media y valores de desviación estándar menor 2% indican que los datos están agrupados y cerca la media. (Anderson, 2010)

En las Tablas 21, 22, 23, 24 y 25 muestran la desviación estándar obtenida del microorganismo *E. coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* presenta una tendencia menor al 2%, a cuál se evidencia con la agrupación de los datos muy cercanos alrededor de la media; además, la desviación estándar de los microorganismos mencionados anteriormente nos indica que son preciso, repetibles y reproducibles.

Los resultados obtenidos muestran que tan lejos están del valor real al realizarla bajo varias condiciones en el laboratorio utilizando la misma muestra homogénea. La desviación estándar que se muestran en las tablas mencionadas anteriormente presenta porcentajes menor al 2%, lo que nos muestra que no se observa una diferencia significativa entre los valores obtenidos en la prueba, siendo un método preciso, el coeficiente de variación (CV) no presenta un porcentaje mayor al 10%. Asimismo, se puede evidenciar que la precisión, repetibilidad y la reproducibilidad tiene un grado del 95% de confianza, mostrando que el método cumple con lo establecido por la USP

13. EVALUACION DEL PRODUCTO ENZYMED LOTE 1: 101117, LOTE 2: 111217 Y LOTE 3: 111117

A continuación, se observan resultados obtenidos para los lotes analizados, expresados en UFC, mostrando el porcentaje de recuperación de cada uno de los microorganismos utilizados para el producto Enzymed Tabletas.

Tabla 28: Resultados producto Enzymed tabletas en método convencional.

LOTE 1 PROCUETO ENZYMED TABLETAS (MÉTODO CONVENCIONAL)					
	MUESTRAS	Rct 1	Rct 2	promedio	%RECUP
<i>Escherichia coli</i>	M1	367	368	368	340,28
	M2	304	365	335	309,72
	M3	319	365	342	316,67
<i>Candida albicans</i>	M1	63	66	65	63,24
	M2	65	63	64	62,75
	M3	67	61	64	62,75
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	M1	99	93	96	75,00
	M2	93	98	96	74,61
	M3	92	92	92	71,88
LOTE 2 PROCUETO ENZYMED TABLETAS					
<i>Escherichia coli</i>	M1	317	369	353	326,85
	M2	380	378	379	350,93
	M3	319	355	337	312,04
<i>Candida albicans</i>	M1	67	69	68	66,67
	M2	64	66	65	63,73
	M3	67	65	66	64,71
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	M1	99	98	99	76,95
	M2	97	96	97	75,39
	M3	99	98	99	76,95
LOTE 3 PROCUETO ENZYMED TABLETAS					
<i>Escherichia coli</i>	M1	370	356	363	336,11
	M2	379	324	352	325,46
	M3	356	342	349	323,15
<i>Candida albicans</i>	M1	62	68	65	63,73
	M2	65	66	66	64,22
	M3	62	63	63	61,27
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	M1	93	95	94	73,44
	M2	92	90	91	71,09
	M3	94	90	92	71,88

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP).

Tabla 29: Resultados del producto Enzymed tabletas Placas Petrifilm.

LOTE 1 PROCUCTO ENZYMED TABLETAS (PLACAS PETRIFILM)					
	MUESTRAS	Rct 1	Rct 2	promedio	%RECUP
<i>Escherichia coli</i>	M1	388	366	377	349,07
	M2	389	368	379	350,46
	M3	400	388	394	364,81
<i>Candida albicans</i>	61	62	62	62	60,54
	64	62	63	63	61,27
	66	66	66	66	64,71
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	98	93	91	92	71,88
	99	91	90	91	70,70
	92	90	97	94	73,05
LOTE 2 PROCUCTO ENZYMED TABLETAS					
<i>Escherichia coli</i>	M1	400	388	394	364,81
	M2	367	399	383	354,63
	M3	387	377	382	353,70
<i>Candida albicans</i>	M1	63	65	64	62,75
	M2	65	63	64	62,75
	M3	63	63	63	61,76
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	M1	99	99	99	77,34
	M2	98	95	97	75,39
	M3	97	96	96	76,73
LOTE 3 PROCUCTO ENZYMED TABLETAS					
<i>Escherichia coli</i>	M1	387	388	388	280,80
	M2	388	399	394	285,14
	M3	385	377	381	276,09
<i>Candida albicans</i>	M1	64	68	66	59,46
	M2	67	61	64	57,66
	M3	62	61	62	55,41
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	M1	98	98	98	76,56
	M2	99	97	98	76,56
	M3	99	98	99	76,95

*Siglas: Recuento (Rto), Porcentaje de recuperación (%RECUP).

Los resultados obtenidos de los análisis realizados de 3 lotes cada uno de 3 se hace con el fin de dar cumplimiento según lo estipulado por la USP. Es importante observar el comportamiento homogéneo en cuanto a la recuperación microbiana de las 3 muestras de los 3 lotes con los microorganismos estandarizados (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*). logrando así comprobar la aptitud el método en recuento en placa y placas Petrifilm. Es importante mencionar que para el *Escherichia coli* el porcentaje de recuperación fue mayor, debido a que en el

trascuro de la evaluación de los lotes con diferentes muestras se llevó a cabo un lapso de tiempo prolongado máximo a 4 horas, cuando se recomienda para estos ensayos máximo 2 horas ya que *E. coli* se multiplica cada 20 minutos.

4. Resultados Análisis de costo beneficio (CBA).

Tabla 30: Resultados de costo para la ejecución del proyecto utilizando placas petrifilm

PLACAS PETRIFILM					
Descripción	Cantidad			V. Unitario	Total
MATERIALES					
Sharpies	1	und	\$	2.875	2875
Toallas Wypal	1	und	\$	41.568	41568
cajas de guantes	10	und	\$	464	4640
Cajas de gorros	10	und	\$	150	1500
cajas de tapabocas	10	und	\$	181	1810
Probeta de 1000ml	1	und	\$	124.950	124950
Probeta de 100ml	1	und	\$	33.320	33320
Gradillas	4	und	\$	35.700	142800
Racks Puntas azules	1	und	\$	20.000	20000
Bolsa de punta azules	96	und	\$	172	16512
Geringa	7	und	\$	450	3150
Celdas	4	und	\$	19.450	77800
REACTIVOS Y MEDIOS					
Petrifilm <i>E.coli</i> /coliformes	8		\$	250.000	2000000
Petrifilm Hongos y Levaduras	8		\$	250.000	2000000
Escala McFarland	1		\$	75.400	75400
Alcohol Etilico	1		\$	20.230	20230
Tween 80	450		\$	814	366300
EQUIPO					
Espectrofotómetro	1		\$	1.692.000	1692000
Incubadora 30-35°C (+/- 2,5) BINDER	1		\$	9.396.000	9396000
Incubadora 20-25°C (+/- 2,5) LESCO	1		\$	9.396.000	9396000
Nevera congelar (Medios)	1		\$	2.900.000	2900000
Nevera Challenger (Cepas)	1		\$	1.440.000	1440000
Congelador de cepas	1		\$	1.740.000	1740000
Autoclave tuttner (PM)	1		\$	1.800.000	1800000
Autoclave All American 1 (DS)	1		\$	986.000	986000
Plancha de Calentamiento VELD	1		\$	1.700.000	1700000
pH-metro Ohaus	1		\$	118.320	118320
Balanza sartorius	1		\$	118.320	118320
Balanza analítica OHAUS	1		\$	592.760	592760
Datalogger temperatura Humedad	1		\$	416.500	416500
Datalogger Incubadora	1		\$	380.000	380000
Micropipeta 100-1000 omnipette	1		\$	803.880	803880
Micropipeta 1-10 mL BOECO	1		\$	803.880	803880
Cabina de bioseguridad	1		\$	14.536.000	14536000
TOTAL					53752515

Tabla 31: Resultados de costo para la ejecución del proyecto utilizando placas petrifilm

METODO CONVENCIONAL					
Descripción	Cantidad			V. Unitario	Total
MATERIALES					
Sharpies	1	und	\$	2.875	2875
Toallas Wypal	1	und	\$	41.568	41568
cinta de enmascarar	1	und	\$	4.500	4500
cinta indicadora	1	und	\$	45220	45220
cajas de guantes	10	und	\$	464	4640
Cajas de gorros	10	und	\$	150	1500
cajas de tapabocas	10	und	\$	181	1810
Frascos de schott de 1000m	8	und	\$	20.827	166616
Frascos de schott de 100m	10	und	\$	12.130	121300
Tubos 10ml	60	und	\$	1.392	83520
Probeta de 100ml	1	und	\$	33.320	33320
Gradillas	4	und	\$	35.700	142800
Racks Puntas azules	1	und	\$	20.000	20000
Bolsa de punta azules	96	und	\$	172	16512
cajas petris grandes.	210	und	\$	450	94500
Geringa	7	und	\$	450	3150
Celdas	4	und	\$	19.450	77800
REACTIVOS Y MEDIOS					
Agar MacConkey (MK)	500	gr	\$	466	233000
Agar AS	500	gr	\$	365	182500
Agar TSA	500	gr	\$	538	269000
Agar TSB	500	gr	\$	538	269000
Escala McFarland	1		\$	75400	75400
Alcohol Etilico	1		\$	20230	20230
Tween 80	2	ml	\$	814	1628
EQUIPO					
Espectrofotómetro	1		\$	1.692.000	1692000
Incubadora 30-35°C (+/- 2,5) BINDER	1		\$	9.396.000	9396000
Incubadora 20-25°C (+/- 2,5) LESCO	1		\$	9.396.000	9396000
Nevera congelar (Medios)	1		\$	2.900.000	2900000
Nevera Challenger (Cepas)	1		\$	1.440.000	1440000
Congelador de cepas	1		\$	1.740.000	1740000
Autoclave tuttner (Preparación de medios)	1		\$	1.800.000	1800000
Autoclave All American 1 (desactivación de materia)	1		\$	986.000	986000
Plancha de Calentamiento VELD	1		\$	1.700.000	1700000
pH-metro Ohaus	1		\$	118.320	118320
Balanza sartorius	1		\$	118.320	118320
Balanza analítica OHAUS	1		\$	592.760	592760
Datalogger Incubadora húmeda y temperatura	1		\$	416.500	416500
Datalogger Incubadora	1		\$	380.000	380000
Micropipeta 100-1000 omnipette	1		\$	803.880	803880
Micropipeta 1-10 mL BOECO	1		\$	803.880	803880
Cabina de bioseguridad	1		\$	14.536.000	14536000
Termómetro Infrarrojo	1		\$	166.239	166239
TOTAL					50898288

Los resultados obtenidos de los costos-beneficios se muestran en la Tabla 30 y 31, señalando un paralelo de cada uno del análisis microbiológico utilizando método convencional y placas Petrifilm; por su parte, la matriz de los costos permite evidenciar los gastos que se llevan a cabo en realizar los análisis de un proyecto de investigación o un análisis de rutina dentro del laboratorio. Estos costos demuestran que la técnica convencional constituye a simple vista, ser una opción económica presente en el mercado en lo que se refiere a materiales, reactivos y medios; sin embargo, a su vez demanda altos precios en lo que se refiere a mano de obra, esterilización de los medios, espacios, tiempos de análisis y en obtener resultados. Consecuente con este señalamiento, se pudo evidenciar que las placas Petrifilm proporcionan un ahorro en cuanto a mano de obra; ya que se omiten los pasos de preparación de medios, como alistamiento del material, pesaje esterilización, etc.; lo cual de acuerdo con las necesidades actuales representa ser un enorme beneficio para la obtención rápida de resultados. Adicionalmente, esta técnica nos permite evitar pasos de confirmación por la presencia de sustancias cromógenas específicas para los microorganismos de interés.

En este sentido, la ejecución de las pruebas rápidas en el laboratorio aporta múltiples beneficios como ahorro de tiempo y trabajo, reproducibilidad, exactitud y consistencia en los resultados, fácil interpretación, ahorro en espacio, ahorro de costos en servicios como energía y agua, ahorro en detergentes y desinfectantes, ahorro de costos en almacenamiento y bodegaje, así como gastos generales de la operación. (Zendejas et al., 2014). Tenido en cuenta lo anterior, se puede decir que en el mercado la inversión en insumos y reactivos es aparentemente menor en comparación con los costos de las técnicas rápidas.

Este proyecto se realizó con el fin de validar las placas petrifilm para el uso en la industria farmacéutica, para garantizar a los clientes un análisis rápido, preciso y confiable en los resultados. Cabe mencionar que en este proyecto se hizo la primera fase, teniendo en cuenta algunos parámetros estadísticos, para la validación de las placas petrifilm. Dentro de los parámetros analíticos se llevaron a cabo 3 (precisión, repetibilidad y reproducibilidad). En la segunda fase de la validación, se propone completar los parámetros estadístico faltantes, teniendo en cuenta las observaciones en cuanto al inóculo, neutralizante (Tween 80), el área de las placas petrifilm y componentes del diluyente que pueden afectar el comportamiento de los microorganismos en las placas petrifilm debido que se desconoce los componentes de estas.

14. CONCLUSIONES

- Mediante resultados obtenidos en la precisión intermedia se pudo concluir que las placas petrifilm y método convencional es preciso bajo las condiciones establecidas en la aptitud del método utilizado en el laboratorio.
- Los resultados obtenidos permiten concluir que el método analítico para la precisión repetibilidad y reproducibilidad nos permite obtener resultados satisfactorios en cuanto al porcentaje de recuperación.

Los resultados obtenidos en la precisión, repetibilidad y reproducibilidad mostro en cuanto a los criterios de aceptación: desviación estándar (RSD) < 10% y coeficiente de variación (DS) <2% que son preciso repetible y reproducible.

- Se logró determinar los gastos de un análisis microbiológico que se requiera para una muestra determinada, donde se concluye que las técnicas convencionales a nivel de laboratorio son más económicas en términos de costo de materiales y reactivos, pero a su vez establece ser la opción más costosa en lo que se representa la mano de obra, espacios en la incubadora y el tiempo de espera de los resultados.
- La simplicidad de la técnica placas Petrifilm permiten un avance rápido, debido a que elimina las tareas de preparación de medios que requieren mucho tiempo y conseguir resultados exactos y coherentes, para una mayor visualización de las colonias. Además, ofrece ventajas adicionales en el control de calidad microbiología para el área de alimentos y farmacéuticas.
- La técnica para el recuento rápido en placas Petrifilm representa, en el laboratorio, una reducción del 40% en cuanto a mano de obra, ya que se pueden omitir pasos en el laboratorio microbiológico. Sin embargo, los costos de los productos finales son superiores si se comparan con los producidos con las técnicas convencionales.

15. GLOSARIO

Colonia: Agrupación de un conjunto de microorganismos de un mismo tipo. Algunos microorganismos que forman colonias son las bacterias, los hongos y los protozoos. (Pérez, J. y Gardey, A. 2011).

Humedad relativa: Cantidad de agua en el aire en forma de vapor, comparada con la cantidad máxima de agua que puede ser mantenida a una temperatura dada. (Hernández, 2014).

Industria farmacéutica: Para Sector que se dedica a la fabricación, preparación y comercialización de productos químicos medicinales para el tratamiento o también prevención de las enfermedades. Además, las compañías farmacéuticas también realizan tareas de investigación y desarrollo. (Abrutzky; Bramuglia y Godio 2012).

Parámetros cuantitativos: Para López *et al* (2012); los parámetros cuantitativos son límites y estructuras de medición con cantidades numéricas.

Placas Petrifilm: Método de medición para determinar la población de bacterias aerobias en 48 horas en una muestra determinada. (Alonso y Poveda 2008).

Propiedades organolépticas: Son todas aquellas descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, según las pueden percibir los sentidos de los seres humanos. (Callemien & Collin, 2010).

Reología: Es la rama de la física de medios continuos que se dedica al estudio de la deformación y el fluir de la materia. (García, 2007).

Solución oftálmica: Compuesto líquido que sirve para tratar algunas patologías, molestias e infecciones bacterianas del ojo. (Schena, 2012).

Técnicas microbiológicas: Conjunto de pasos y procedimientos que se utilizan para detectar si hay microorganismos sobre una muestra; identificarlos y cuantificarlos. (Vásquez, *et al* 2011).

Temperatura: Para Neira y Pérez (2016); la temperatura es un sistema de medición para determinar el nivel térmico o el calor que posee un cuerpo o la atmosfera en general.

Precisión intermedia: Precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea (Eserian & Lombardo, 2015).

Repetibilidad: Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo (Delmotte, *et al.*, 2011)

Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología. (Delmotte & Laverge, 2011).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC** por sus siglas en inglés) es una bacteria que infecta principalmente a niños menores de dos años provocando diarreas de diversos grados(Campos, 2015).

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC** por sus siglas en inglés) son una causa frecuente de diarrea en lactantes de países en desarrollo, así como la causa más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo(Campos, 2015).

***Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC** por sus siglas en inglés) La colitis hemorrágica es un padecimiento auto limitado, caracterizado por diarrea de inicio brusco con dolor abdominal. Las evacuaciones líquidas se acompañan de una descarga hemorrágica. El síndrome urémico hemolítico es una de las principales causas de daño renal en niños, se define por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal aguda y trombocitopenia (Campos, 2015).

Patógeno oportunista: Aquellos microorganismos con potencial de producir enfermedad solo cuando la resistencia del hospedador es deficiente; por ejemplo, en caso de enfermedades, inflamación, infecciones previas, inmunodeficiencia y según la edad(Zendejas, *et al.*, 2014)

Validación: Confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto (Delmotte, *et al* 2011)

16. BIBLIOGRAFIA

- Adeyeye, S. A. O. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>
- Abrutzky, R.; Bramuglia, C. y Godio, C. (2012). Análisis de la industria farmacéutica estatal en Argentina. Instituto de Investigaciones Gino Germani, Facultad de Ciencias Sociales, Universidad de Buenos Aires. Recuperado de <http://biblioteca.clacso.edu.ar/gsd/collect/ar/ar-030/index/assoc/D6461.dir/dji34.pdf>
- Alonso, N. y Poveda, J. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3M™ para el análisis de alimentos. Pontifici Universidad Javeriana. Bogotá D.C., 23p. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>
- Angelina, A., Aubert, C., Solans, X., María, R., & Espadalé, A. (2008). Micotoxinas en ambientes laborales, 82, 2002.
- Anderson, R. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. *Unodc*, 1, 76. <https://doi.org/ST/NAR/41>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145. Recuperado de http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
- BETANCOURT, D. P. (2006). Resolución 1478 De 2006. 10 Mayo, 1–43. Retrieved from https://www.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/resoluciones/resolucion_001478_de_2006.pdf
- Betelgeux (2018). *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I). Seguridad e higiene alimentaria. (Consultado el 19-03-2018). Recuperado de <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Belouafa, S., Habi, F., Benhar, S., Belafkih, B., Tayane, S., Hamdouch, S., ... Abourriche, A. (2017). Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples★. *International Journal of Metrology and Quality Engineering*, 8, 9. <https://doi.org/10.1051/ijmqe/2016030>
- Campos, C. A. E. (2015). INFECCIONES POR ESCHERICHIA COLI - Recursos en Bacteriología - UNAM. Retrieved from <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
- Callemien, D., & Collin, S. (2010). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. *Food Reviews*

International, 26(1), 1–84. Recuperado de <https://doi.org/10.1080/87559120903157954>

- Carrillo, E., & Lozano, A. (2008). Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua Carrillo, E., & Lozano, A. (2008). Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana, 1–82. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis203.pdf>
- Castro, C. y Martín, E. (2007). Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sevilla. 10p. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/Cdublinien.pdf>
- Cera, H. (2009). Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos Subcomisión de Buenas Prácticas. Asociación argentina de Microbiología. 544p. Recuperado de <http://www.aam.org.ar/download-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>
- Clasificación Industrial Internacional Uniforme (CIIU). Fabricación de productos farmacéuticos, sustancias químicas medicinales y productos botánicos. Recuperado de <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/03/PART3.pdf>
- Cortés, A. y Mosqueda, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, vol. 12, núm. 2, agosto-, pp. 64-90 Universidad de Buenos Aires, argentina. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/863/86328550002.pdf>
- Delmotte, C., & Laverge, J. (2011). Interlaboratory test for the determination of repeatability and reproducibility of buildings airtightness measurements. *32nd AIVC Conference ; 1st TightVent Conference : Towards Optimal Airtightness Performance*, (October 2011). Retrieved from <https://biblio.ugent.be/publication/1980491>
- David Greenwood, Richard Slack, John Peuthere, M. B. (2007). *Medical Microbiology*.
- El-Houssieny, R. S., Aboulwafa, M. M., Elkhatib, W. F., & Hassouna, N. A. H. (2013). Recovery and detection of microbial contaminants in some non-sterile pharmaceutical products. *Archives of Clinical Microbiology*, 4(6), 1–14. <https://doi.org/10.3823/278>
- Eserian, J. K., & Lombardo, M. (2015). Method validation in pharmaceutical analysis: from theory to practical optimization. *Innovations in Pharmacy*, 6(1), 5–7.
- European Commission. (2011). Good Manufacturing practice. Medicinal Products

for Human and Veterinary use. Chapter 2.

Fundación elika. (2013). Aflatoxinas. Elika, 1–4. Retrieved from. Recuperado de http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento107/19.Aflatoxinas.pdf

García, J. (2007). Reología. Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química. Recuperado de <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/2003/1/tema1rua.pdf>

Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., ... Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>

Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). Metodología de la investigación. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Hernández, P. (2014). Humedad relativa. Confort térmico. Recuperado de <https://pedrojhernandez.com/tag/humedad-relativa/>

Jasso, L. (2011). Infecciones de baja frecuencia en los neonatos. Algunos aspectos relevantes. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 68(1), 7–20

Juridica, N. (2012). Ministerio de salud y proteccion social. Recuperado de https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/normatividad-institucional/2012/decreto_2078.pdf

Koedrith, P., E. Dubois, B. Scherens, E. Jacobs, C. Boonchird y F. Messenguy, (2008). Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.147, *Science Asia*, 34, 147-152

Kolomeisky, A. B., & Scuseria, G. (2011). Instituto Politecnico Nacional, Centro de investigacion en Ciencia Aplicada y Tecnologia Avanzada del intituto politecnico nacional, tesis de grado. (November). Recuperado de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9987/184.pdf?sequence=1>

Larrea, J. *et al* (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 44, núm. 3, pp. 24-34 Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181229302004.pdf>

Linealidad, I. D. E., Cuantificación, L. D. E., Detección, L. D. E., Referencia, M. D. E., Certificado, M. D. E. R., Referencia, M. E. D. E., ... Bureau, N. (n.d.). Guía de validación de métodos analíticos, 1–18.

López, A. *et al* (2012). Indicadores cuantitativos y cualitativos para la evaluación de

la actividad investigadora: ¿Complementarios? ¿Contradictorios? ¿Excluyentes? Cuadernos IRC. Córdoba, Argentina. Recuperado de: http://www.uca.es/recursos/doc/Unidades/consejo_social/590987125_103201_0104118.pdf

Luca, I. (2009). 3M Seguridad Alimentaria Consistencia y Productividad maximizadas. *3M Seguridad Alimentaria*, 25(19), 6 Recuperado de: http://solutions.productos3m.es/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=e_WW&md=1307530995000&assetId=1273685360656&assetType=MMM_Image&blobAttribute=ImageFile

Maldonado, M. *et al* (2014). Bioaerosoles y evaluación de la calidad del aire en dos centros hospitalarios ubicados en León, Guanajuato, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 30 (4) 351-363. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v30n4/v30n4a4.pdf>

Mejía, J. *et al* (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Información Tecnológica – Vol. 27 N° 4.* 14p. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v27n4/art02.pdf>

Morales, M. (2009). Los Hongos. *Biología. Revista Digital Innovación y Experiencias Educativas.* Granada, España. Recuperado de https://archivos.csif.es/archivos/andalucia/ensenanza/revistas/csicsif/revista/pdf/Numero_17/MARIA%20LUISA_MORALES_1.pdf

Mosquera Ayala Diego Alejandro. (2012). Estandarización De Un Método Para La Cuantificación De Pesticidas Organoclorados Y Organofosforados En Suelos Por Cromatografía De Gases Con Detectores Fid Y Ecd., 98.

Morrillas, P., Barwick, V., Ellison Stephen, Engman, J., & Magnusson, B. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados.* <https://doi.org/ST/NAR/41>

Neira, L. y Pérez, E. (2016). Temperatura y calor: conceptos básicos en los textos de física en la educación media general. *ARJÉ. Revista de Postgrado FaCE-UC.* Vol. 10 N° 19. Julio– Diciembre. pp.41-54. Recuperado de <http://arje.bc.uc.edu.ve/arj19/art03.pdf>

Organización Mundial de la Salud-OMS (2013). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica. Red PARF Documento Técnico N° 11. Recuperado de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=19768&lang=en

Ordoñez Parra, M. A., & Rojas Salazar, D. M. (2007). Diseño y Elaboración de una Guía Preliminar para la Validación de Métodos Microbiológicos Estándar, 1–68.

- Parra, R. (2010). Revisión: Microencapsulación de alimentos. Rev.Fac. Nal.Agr. Medellín 63(2):5669-5684. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf>
- Pérez, J. y Gardey, A. (2011). Actualizado: 2014. Definición de colonia. Recuperado de <https://definicion.de/colonia/v>
- Pérez, J. y Gardey, A. Publicado: 2011. Actualizado: 2014. Definición de: Definición de dimorfismo. Recuperado de <https://definicion.de/dimorfismo/>
- Pérez, J. y Merino, M. Publicado: 2015. Actualizado: 2016. Definiciones: Definición de unicelular. Recuperado de <https://definicion.de/unicelular/>
- Pérez, M. (2014). Biología avanzada: organismos pluricelulares. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; México. Recuperado de https://www.uaeh.edu.mx/docencia/P_Presentaciones/prepa3/Presentaciones_Enero_Junio_2014/Organismos%20pluricelulares.pdf
- Perilla Jiménez Laura margarita (2013). verificación de la Aptitud de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos para productos terminados elaborados en Anglopharma S.A. Pontificia Universidad Javeriana Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16188/PerillaJimenezLauraMargarita2013.pdf?sequence=1>
- Pineda, J. (2015). Candidiasis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev. Méd. Risaralda 2017; 23 (1): 38 - 44. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v23n1/v23n1a09.pdf>
- Schena, L. (2012). Oftalmología. American Academy of Ophthalmology. N°1, octubre. Recuperado de [http://www.aaojournal.org/article/S0161-6420\(12\)00756-7/pdf](http://www.aaojournal.org/article/S0161-6420(12)00756-7/pdf)
- Ravelo Abreu, A., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A. J., & Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina a en alimentos de consumo humano: Revisión. Nutrición Hospitalaria, 26(6), 1215–1226. Recuperado de <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5381>
- Seiler, H. (2011). Levaduras y mohos, 744–753.
- Serrano, H. y Cardona, N. (2015). Tirotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. Rev CES Med;29(1):143-152. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v29n1/v29n1a12.pdf>
- Social, M. de la P. (2007). Resolución 1403. *Resolución 1403, 2007*, 74.
- Social, M. de salud y proteccion. (2013). RS_INVIMA_3619_2013.pdf. Retrieved

from<http://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/R/esoluci3619de2013.pdf%5Cn>

Sorribes, C. H. (2008). Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. VI Workshop Mrama, 87–109.

Sugar, A. (2018). Introducción a las infecciones por hongos. Manual MSD. Infecciones por hongos (infecciones fúngicas, micosis). (Consultado el 19-03-2018) Recuperado de <https://www.msmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/infecciones-por-hongos-infecciones-f%C3%BAngicas,-micosis/introducci%C3%B3n-a-las-infecciones-por-hongos>

Score, P. (2003). *Candida albicans*, 40–41. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.043>

Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21. Recuperado de <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

Tanaka, K. (2012). *Candida albicans*. *DataBio*, 12(34), 2433–2442. <https://doi.org/10.1128/AAC.01366-12>

Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). Decreto numero 677 de 1995. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Universidad Central de Venezuela-UCV (2012). Laboratorio de microbiología – control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no estériles. 19p. Recuperado de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Control_Microbiol%C3%B3gico_PNE.pdf

Universidad Nacional de la Patagonia: San Juan Bosco. (2016). Botánica general. (Revisado el 23-04-2018) Recuperado de <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/botanicageneral/wp-content/uploads/2016/03/Generalidades-de-BOTANICA-y-Taxonomia.pdf>

USP, P. (2016). Usp 39 - Nf 34. The United States Pharmacopeia.

Vásquez, C. et al (2010). Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias. REDUCA, Vol. 3 Núm. 5. Recuperado de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/819/834>

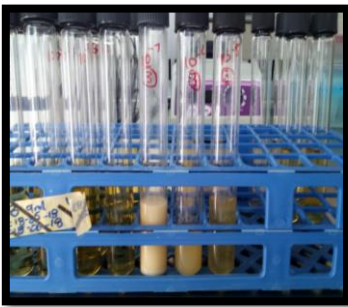
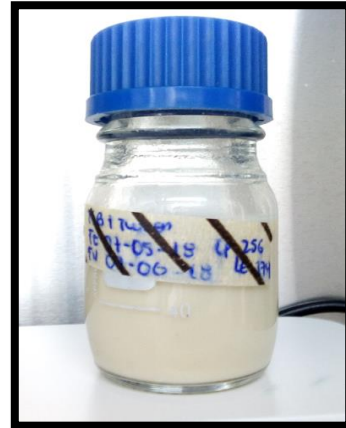
Vera, G. (2009). Introducción a la microbiología. Editorial Universidad Estatal a Distancia-EUNED. Recuperado de https://books.google.com.co/books?id=K_ETVnqnMZIC&pg=PA108&dq=que+son+las+levaduras&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiQn7X75_jZAhXox1kKHdLMDM4Q6AEIKDAA#v=onepage&q=que%20son%20las%20levaduras&f=false

Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., ... Nishikawa,

- Y. (2013). Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka city, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1232–1240. Recuperado de <https://doi.org/10.1128/AEM.03380-12>
- Zumbado Salazar, C., Ulloa Fallas, M., & Rojas Soto, G. (2014). Oncología Aflatoxina B1 Y Su Relación. *Revista Médica De Costa Rica Y Centroamérica*, 1(612), 637–641. Retrieved from. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2014/rmc144d.pdf>
- Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Revista Biomed*, 25(3), 129–143.

17. ANEXOS

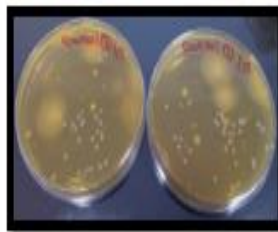
Anexo1: Registro fotográfico de los ensayos preliminares de la validación de la aptitud del método (método convencional y placas petrifilm).



CONTROLES



Escherichia coli



Candida albicans



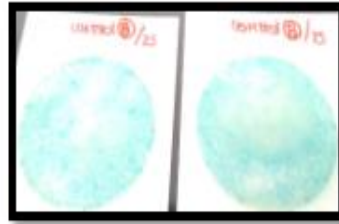
Aspergillus. Brasiliensis



Escherichia coli

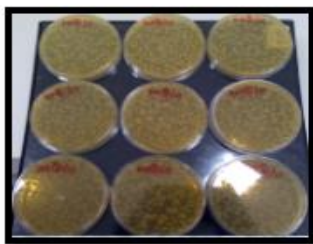


Candida albicans

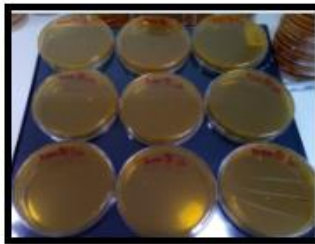


Aspergillus brasiliensis

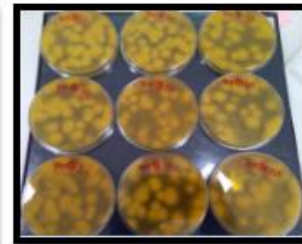
PRESICION



Escherichia coli



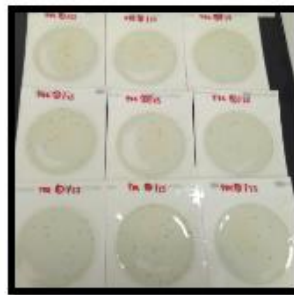
Candida albicans



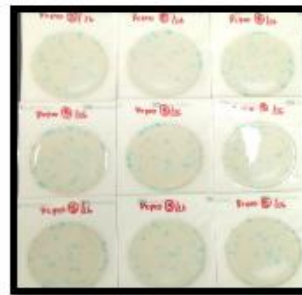
Aspergillus brasiliensis



Escherichia coli

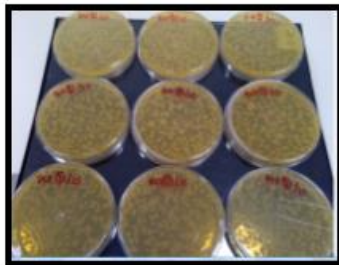


Candida albicans

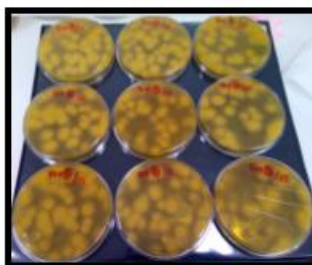


Aspergillus brasiliensis

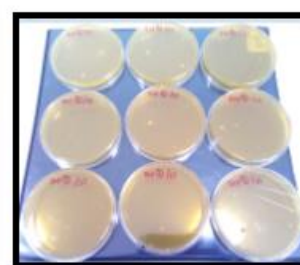
REPETIBILIDAD



Escherichia coli

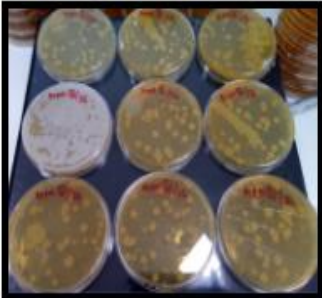


Candida albicans

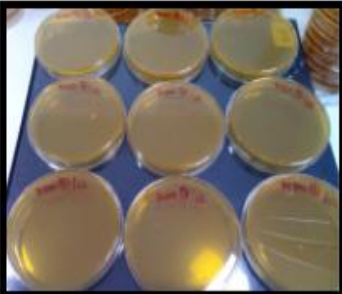


Aspergillus brasiliensis

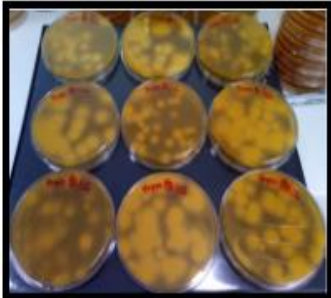
REPRODUCIBILIDAD



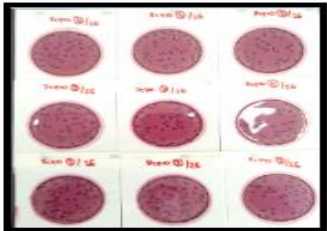
Escherichia coli



Candida albicans



Aspergillus brasiliensis



Escherichia coli

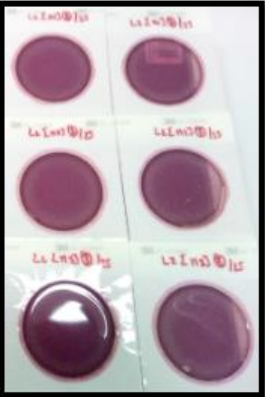


Candida albicans

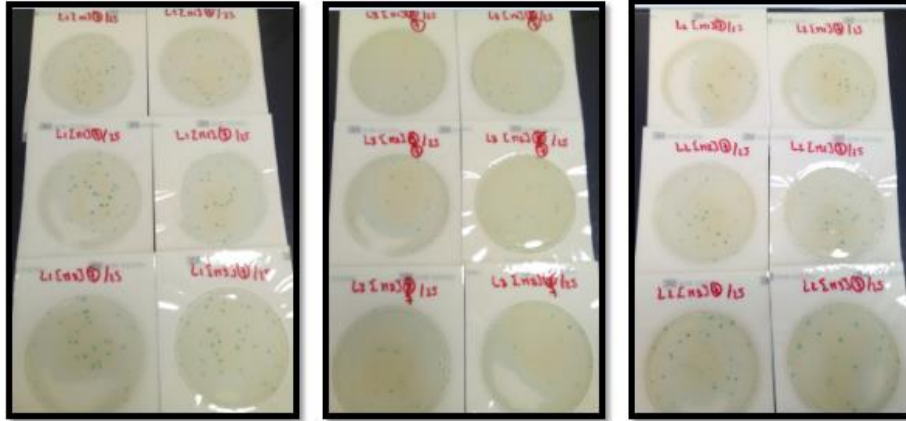


Aspergillus brasiliensis

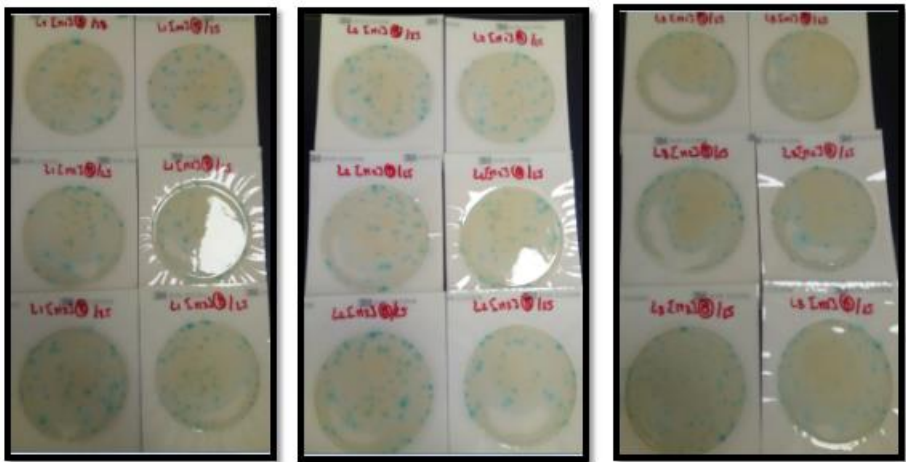
LOTES



Escherichia coli



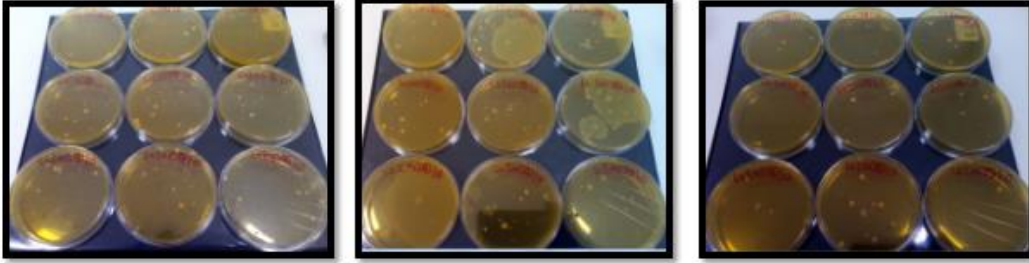
Candida albicans



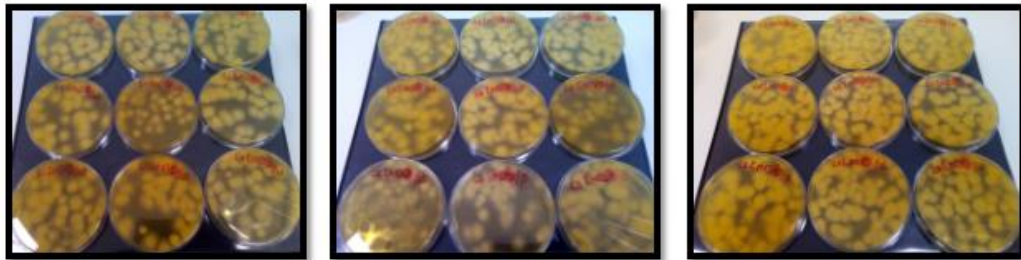
Aspergillus brasiliensis



Escherichia coli



Candida albicans



Aspergillus brasiliensis

EJECUCION DEL TRABAJO:



Anexo 2: Aptitud del método establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos de América.

Aptitud del Método de Recuento en Presencia del Producto

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El método para preparar la muestra depende de las características físicas del producto a examinar. Si ninguno de los procedimientos que se describen a continuación resultara satisfactorio, se debe desarrollar un procedimiento alternativo adecuado.

Productos Solubles en Agua—Disolver o diluir (por lo general se prepara una dilución 1 en 10) del producto a examinar en *Solución Amortiguada de Cloruro de Sodio–Peptona de pH 7,0*, en *Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7,2* o en *Caldo Digerido de Caseína y Soja*. Si fuera necesario, ajustar a un pH de 6 a 8. Preparar diluciones adicionales, con el mismo diluyente, si fuera necesario.

Productos No Grasos Insolubles en Agua—Suspender el producto a analizar (por lo general se prepara una dilución 1 en 10) en *Solución Amortiguada de Cloruro de Sodio–Peptona de pH 7,0*, en *Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7,2* o en *Caldo Digerido de Caseína y Soja*. Se puede añadir un agente tensoactivo, tal como 1 g por L de polisorbato 80, para favorecer la suspensión de sustancias poco humectables. Si fuera necesario, ajustar a un pH de 6 a 8. Preparar diluciones adicionales, con el mismo diluyente, si fuera necesario.

Productos Grasos—Disolver el producto a examinar en miristato de isopropilo esterilizado por filtración o mezclarlo con la cantidad mínima necesaria de polisorbato 80 estéril u otro reactivo tensoactivo estéril no inhibitorio que se calienta, si fuera necesario, a no más de 40° o, en casos excepcionales, a no más de 45°. Mezclar cuidadosamente y, si fuera necesario, mantener la temperatura en un baño de agua. Agregar una cantidad suficiente del diluyente seleccionado precalentado para obtener una dilución 1 en 10 del producto original. Mezclar cuidadosamente, manteniendo la temperatura durante el menor tiempo necesario para la formación de una emulsión. Se puede preparar una serie de diluciones decimales adicionales empleando el diluyente seleccionado que contenga una concentración adecuada de polisorbato 80 estéril u otro reactivo tensoactivo estéril no inhibitorio.

Líquidos o Sólidos en Forma de Aerosol—Transferir el producto asépticamente a un aparato con filtro de membrana o un recipiente estéril para un muestreo posterior. Usar el contenido completo o una cantidad definida de dosis fijas de cada envase analizado.

Parches Transdérmicos—Retirar las láminas protectoras ("cubiertas de protección") de los parches transdérmicos y colocarlas, con el adhesivo hacia arriba, sobre bandejas de vidrio o plástico estériles. Cubrir la superficie adhesiva con un material poroso estéril adecuado (p.ej., gasa estéril) para prevenir que los parches se peguen unos a otros y transferirlos a un volumen adecuado del diluyente seleccionado que contenga inactivadores tales como polisorbato 80 y/o lecitina. Agitar la preparación vigorosamente por lo menos durante 30 minutos.

Aptitud del Método de Prueba

Para cada producto nuevo a analizar, realizar una preparación de la muestra según se indica en el párrafo pertinente en *Pruebas de Productos*. Al momento de la mezcla, agregar cada cepa de prueba en el medio de crecimiento indicado. Inocular individualmente las cepas de prueba. Usar un número de microorganismos equivalente a no más de 100 ufc en la preparación de prueba inoculada.

Realizar la prueba según se indica en el párrafo pertinente en *Pruebas de Productos* empleando el período más corto de incubación indicado.

Se deben detectar los microorganismos específicos con las reacciones indicadoras según se describe en *Pruebas de Productos*.

Cualquier actividad antimicrobiana del producto requiere de una modificación del procedimiento de la prueba (ver *Neutralización/ Eliminación de la Actividad Antimicrobiana en Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano* (61)).

Para un producto determinado, si la actividad antimicrobiana con respecto al microorganismo para el cual se indica la prueba no puede neutralizarse, se asume que el microorganismo inhibido no estará presente en el producto.

PRUEBAS DE PRODUCTOS

Bacterias Gram-Negativas Tolerantes a la Bilis

Preparación de la Muestra e Incubación Previa—Preparar una muestra empleando una dilución 1 en 10 de no menos de 1 g del producto a analizar según se indica en *Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano* (61), excepto que se debe usar *Caldo Digerido de Caseína y Soja* como diluyente de elección, mezclar e incubar a una tempera-

