

**COMPROBACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS NO ESTERILES
FITOTERAPÉUTICOS DE LABORATORIOS LABFARVE SIGUIENDO
METODOLOGÍAS FARMACOPEICAS**

OSWALDO PARRA MAYORGA

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

**COMPROBACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS NO ESTERILES
FITOTERAPÉUTICOS DE LABORATORIOS LABFARVE SIGUIENDO
METODOLOGÍAS FARMACOPEICAS**

OSWALDO PARRA MAYORGA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
MICROBIÓLOGO**

**Tutora: Leidy Barajas Villamizar, Esp
Microbióloga- LABFARVE**

**Tutor: Enrique Alfonso Cabeza Herrera, PhD.
Universidad de Pamplona**

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

Nota de aceptación

Firma Primer Jurado

Firma Segundo Jurado

Pamplona, 14 de Junio de 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a laboratorios LABFARVE por abrirme las puertas y brindarme las herramientas necesarias en este proyecto, a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo y guía durante la elaboración de mi trabajo de grado en especial a mi tutora Leydi Barajas - Microbióloga Esp., a John Hernández - Ph.D., a Lorena Ardila - Microbióloga y a Karla Cruz por su ayuda, dedicación e interés.

“No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta”

José Luis Martín Descalzo

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
1. Objetivos	13
1.1. Objetivo general	13
1.2. Objetivos específicos	13
2. Justificación	14
3. Marco referencial	15
3.1. Marco legal	15
3.2. Marco teórico	16
3.2.1. Generalidades de validación	16
3.2.1.1. Validación	16
3.2.2. Validación primaria.	18
3.2.3. Validación secundaria.	19
3.2.4. Tipos de validación.	19
3.2.4.1. Validación prospectiva	19
3.2.4.2. Validación concurrente.	19
3.2.4.3. Validación retrospectiva.	20
3.2.4.4. Revalidación.	20
3.2.5. Parámetros analíticos del proceso de Validación.	20
3.2.5.1. Límite de detección.	21
3.2.5.2. Límite de cuantificación.	21
3.2.5.3. Exactitud.	21
3.2.5.4. Especificidad.	21
3.2.5.5. Selectividad.	21
3.2.5.6. Precisión.	22
3.2.5.7. Robustez.	22
3.2.6. Técnicas para la validación	23
3.3. Antecedentes	24
4. Metodología	26
4.1. Matriz de selección de productos para verificación de metodologías microbiológicas	26
4.2. Equipos del laboratorio de microbiología	26
4.3. Controles del laboratorio	28
4.3.1. Control microbiológico de ambientes	28
4.3.2. Control microbiológico de las superficies	28
4.3.3. Control de humedad y temperatura	29
4.3.4. Control de limpieza y desinfección de áreas y equipos	29
4.3.5. Control de preparación de medios de cultivo	29
4.3.6. Control de temperaturas de los equipos de microbiología	29
4.3.7. Control de residuos de detergente y lavado y esterilización del material de vidrio	30
4.3.8. Control durante la siembra	30
4.4. Metodologías establecidas para el análisis rutinario de materias primas, materias primas vegetales, material de envase y empaque y producto terminado en el laboratorio de microbiología.	30
4.4.1. Promoción de crecimiento de los medios de cultivo	31
4.5. Cepas cuantificables de referencia	32
4.5.1. Procedimiento de uso de cepas EZ-ACCU SHOT ^(TM)	32

4.6.	Preparación y dilución de la muestra	34
4.7.	Examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de microorganismos específicos.	35
4.7.1	Método recuento de Aerobios Mesófilos	35
4.7.2.	Método recuento en placa de Coliformes Totales y/o <i>Escherichia coli</i> .	36
4.7.3.	Determinación de <i>Salmonella spp.</i> por el método tradicional IN-O10-16	37
4.7.4.	Recuento de Mohos y Levaduras IN-O10-35	38
4.7.5.	Procedimiento para determinar la Ausencia o Presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IN-O10-43	39
4.7.6.	Procedimiento para determinar la Ausencia o Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> IN-O10-45	40
4.8.	Metodologías utilizadas para el procedimiento de verificación	41
4.8.1.	Recuento de Aerobios Mesófilos, Coliformes Totales y Fecales, Mohos y Levaduras.	42
4.8.2.	Verificación metodológica para la determinar la Ausencia/Presencia de <i>Pseudomonas aureginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	43
4.8.3.	Verificación metodológica para la determinar la ausencia/presencia de <i>Salmonella spp.</i>	44
5.	Cronograma de actividades	46
6.	Resultados	47
7.	Análisis de resultados	69
8.	Conclusiones	74
9.	Recomendaciones	74
10.	Glosario	75
11.	Bibliografía	81
12.	Anexos	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Parámetros evaluados tanto para métodos cuantitativos y cualitativos. Marcador no definido.	¡Error!
Tabla 2.	Expresiones de Parámetros de validación y su cálculo.	22
Table 3.	Parámetros establecidos para la matriz de producto.	26
Tabla 4.	Códigos de los Equipos del Laboratorio de Microbiología.	27
Tabla 5.	Medios de Cultivo Deshidratados.	31
Tabla 6.	Cepas que se utilizaron en las Verificación de los métodos Microbiológicos.	34
Tabla 7.	Productos Fitoterapéuticos seleccionados.	47
Tabla 8 .	Prueba de promoción de crecimiento para medios utilizados en la preparación y dilución de las muestras	50
Tabla 9.	Promoción de crecimiento de medios utilizados en la verificación de las metodologías.	50
Tabla 10.	Métodos Verificados en los diferentes Productos Seleccionados.	51
Tabla 11.	Resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Mesófilos <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.	52
Tabla 12.	Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Mesofilos <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.	53
Tabla 13.	Resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Mésofilos de <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.	53
Tabla 14.	Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Mesofilos <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.	54
Tabla 15.	Resultados obtenidos del Método de Recuento de Coliformes Fecales y Coliformes Totales <i>Escherichia coli</i> (ATCC® ™) en Agar VRBA con MUG.	54
Tabla 16.	Imagenes de los resultados obtenidos del método de Recuentode de Coliformes fecales y Coliformes totales <i>Escherichia coli</i> (ATCC® ™) en Agar VRBA con MUG.	55
Tabla 17.	Resultados obtenidos del método de Recuentode de Coliformes fecales y Coliformes totales <i>Escherichia coli</i> (ATCC® ™) en Agar VRBA con MUG.	55
Tabla 18.	Imagenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Coliformes Fecales y Coliformes Totales <i>Escherichia coli</i> (ATCC® ™) Agar VRBA con MUG.	56

Tabla 19.	Resultados obtenidos del método de Recuento de Hongos <i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC® 16404™) en Agar Sabouraud.	56
Tabla 20.	Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Hongos <i>Aspergillus brasiliensis</i> en Agar Sabouraud.	57
Tabla 21.	Resultados obtenidos del método de Recuento de Hongos <i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC® 16404™) en Agar Sabouraud.	57
Tabla 22.	Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Levaduras <i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC® 16404™) en Agar Sabouraud.	58
Tabla 23.	Resultados obtenidos del método de Recuento de Levaduras <i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™) en Agar Sabouraud.	58
Tabla 24.	Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Levaduras <i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™) en Agar Saburoud.	59
Tabla 25.	Resultados obtenidos del método de recuento de Levaduras <i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™) en Agar Sabouraud.	59
Tabla 26.	Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Levaduras <i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™) en Agar Sabouraud.	60
Tabla 27.	Resultados obtenidos para el método de Ausencia/presencia de <i>Salmonella enterica subsp. Entérica serovar typhimurium</i> (ATCC® 14028) en Agar XLD.	60
Tabla 28.	Registra los resultados de los parámetros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de <i>Salmonella spp.</i>	61
Tabla 29.	Imágenes de los resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Salmonella enterica subsp. Entérica serovar typhimurium</i> (ATCC® 14028) en Agar XLD.	61
Tabla 30.	Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Salmonella enterica subsp. Entérica serovar typhimurium</i> (ATCC® 14028) en Agar XLD.	62
Tabla 31.	Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 8739) en Agar MacConkey.	62
Tabla 32.	Resultados de los parámetros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de <i>Escherichia coli</i> .	63
Tabla 33.	Imágenes de resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 8739) en Agar MacConkey.	63
Tabla 34.	Imágenes de resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 8739) en Agar MacConkey.	64

Tabla 35.	Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Pseudomonas aureginosa</i> (ATCC® ™) en Agar Cetrimide.	64
Tabla 36.	Registra los resultados de los parámetros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de <i>Pseudomonas aureginosa</i> .	65
Tabla 37.	Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Pseudomonas aureginosa</i> (ATCC® ™) en Agar Cetrimide.	65
Tabla 38.	Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Pseudomonas aureginosa</i> (ATCC® ™) en Agar Cetrimide.	66
Tabla 39.	Resultados obtenidos para el método de Ausencia / Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® ™) en Agar Manitol.	66
Tabla 40.	Registra los resultados de los parámetros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .	67
Tabla 41.	Imágenes obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® ™) en Agar Manitol.	67
Tabla 42.	Imágenes resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® ™) en Agar Salado Manitol. ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 43.	Escala de valoración del <i>k</i>	70
Tabla 44.	Comparación de los niveles de significancia de los analistas por el Test de MacNemar para metodologías cualitativas, a un valor $p < 0,05$	72
Tabla 45.	Comparación de las medias de los analistas por la prueba de la U de Mann-Whitney (Test no paramétrico)	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Activación de cepas cuantificables.	33
Figura 2. Metodología empleada para recuento de Aerobios Mesofilos, Coliformes totales y fecales, Mohos y levaduras.	42
Figura 3. Metodología empleada para determinar la Ausencia/Presencia de <i>Pseudomonas aureginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	43
Figura 4. Metodología empleada para determinar la Ausencia/Presencia de <i>Salmonella spp.</i>	44
Figura 5. Metodología empleada para determinar la Ausencia/Presencia de <i>Escherichia coli</i> .	45
Figura 6. Microorganismo interferente en verificación de <i>S. aureus</i> .	70

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de selección para comprobación de metodologías microbiológicas	81
Anexo 2. Certificados de análisis de cepas	86
Anexo 3. Medios de cultivo	98

INTRODUCCIÓN

Los medicamentos constituyen uno de los principales compuestos xenobióticos de importancia médica, y son esenciales para el ser humano ya que se utilizan para diagnosticar, prevenir, curar o aliviar enfermedades, y en general para proteger y preservar la salud. A pesar de sus características benéficas y el propósito para el que son elaborados, su uso no está exento de riesgos, entre ellos los relacionados con la dosificación, el incumplimiento de condiciones durante el diseño, procesamiento, almacenamiento, distribución, prescripción, dispensación y modalidades de conservación y uso por los pacientes. (Mora M., 2015)

Por todo lo anterior, para todos los medicamentos, es indispensable garantizar su eficacia y calidad, pues de lo contrario se pondría en riesgo la salud del paciente. En este sentido se debe evaluar el comportamiento de estas sustancias tanto in vivo como in vitro, para así certificar la idoneidad de los productos empleados para las terapias. Por eso a pesar de que la industria farmacéutica es la que ha desarrollado una de las mayores experiencias en lo relacionado al aseguramiento y control de calidad, en la actualidad, dichas organizaciones necesitan establecer sistemas de garantía de calidad cada vez más eficientes para ser competitivas y de esta manera satisfacer las necesidades de los clientes y de la propia empresa, además de sostener la comercialización de los productos (Cabrera C., 2015)

Para asegurar el nivel permitido por el desarrollo científico y la fiabilidad de los resultados, se deben reunir criterios técnicos que aseguren su validez y estos deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables, con independencia del laboratorio que los ejecute. El empleo de métodos de referencia, reconocidos y aceptados, es la herramienta más eficaz para obtener estas garantías. Las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos analíticos han cobrado gran importancia, debido al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más complejos, y al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados (Camaró M., *et al.*, 2015).

La validación de un método microbiológico es un proceso importante para la implementación de una técnica analítica microbiológica, ya que por medio de la validación de dicho método se logra establecer de forma experimental que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para la aplicación prevista y que la valoración es, por lo tanto, adecuada para su uso (USP 40)

En el caso de los métodos normalizados adoptados de la Farmacopea, requieren validación cuando se aplican en matrices diferentes para garantizar un adecuado funcionamiento de la técnica en las condiciones propias del producto y en el entorno en que se realizan. La validación de un método normalizado permite dejar evidencia documentada, del óptimo desempeño de la técnica, garantizando la reproducibilidad de los resultados y por tanto aportando solidez y confianza en los análisis. (Mora C., 2009). Por otro lado, para el cumplimiento del Sistema de Garantía de la Calidad la validación es un requisito imprescindible que está establecido por los entes reguladores en Colombia (INVIMA e ICA), y por comisiones de Farmacopeas (Hoyos M., 2010)

Para garantizar la eficacia antibacteriana, los productos fabricados en la empresa LABFARVE S.A., actualmente se analizan según procedimientos referenciados en la Farmacopea Americana (USP 40), sin embargo se requiere realizar la validación de la metodología de análisis en tres matrices (sólida, semisólida y líquida) ya que un procedimiento validado es más estable pues la validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo. La validación no lleva implícito solamente el desarrollo experimental de los parámetros de validación, sino también toda la documentación involucrada en la misma, donde queda evidencia de cómo fue llevado a cabo todo el proceso, y que servirá como referencia para establecer la metodología analítica que seguirá siendo aplicada.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Comprobar la calidad de los productos fitoterapéuticos no estériles elaborados en el laboratorio LABFARVE siguiendo las metodologías farmacopeicas.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Establecer los prerequisites requeridos para la comprobación de los métodos microbiológicos normalizados en el laboratorio LABFARVE.
- ✓ Evaluar la precisión y la exactitud de los métodos microbiológicos a través de análisis estadísticos especializados.

2. JUSTIFICACIÓN

La validación secundaria o también llamada verificación, tiene lugar cuando un laboratorio, implementa un método desarrollado en otra parte, este tipo de validación se centra en reunir evidencias acerca de que el laboratorio está en la capacidad de cumplir con las especificaciones exigidas en la validación primaria. Normalmente, la validación secundaria emplea formas seleccionadas y simplificadas de los mismos procedimientos empleados en la validación primaria, aunque posiblemente se debe extender por un tiempo mayor. Las muestras naturales constituyen el material de ensayo óptimo y el trabajo solo requiere tratar el procedimiento dentro de los límites operacionales establecidos por la validación primaria (GTC 84).

Cuando se habla de productos farmacéuticos, la calidad de estos es una característica que debe ser comprobada con procedimientos fiables y seguros, esto con la finalidad de cumplir con la legislación farmacéutica actual y exigencias farmacopeicas y para ofrecer a los clientes productos eficaces y con una alta calidad. Por esta razón la industria farmacéutica ha ido estableciendo, enriqueciendo tecnologías y metodologías que logren garantizar la calidad. Es aquí donde radica la importancia de la verificación de cualquier proceso que se vaya a realizar y se transforma en indispensable para el aseguramiento de la calidad.

Laboratorio LABFARVE cuenta con un Departamento de Aseguramiento de la Calidad que cumple con los requisitos y normas establecidas por la legislación vigente y los entes reguladores. Los procesos de fabricación están basados en las **Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)** para garantizar la calidad y pureza de todos los productos.

Los productos Fitoterapéuticos del laboratorio LABFARVE pasan por diversos controles de calidad descrito en la USP 40, entre estos se encuentran las pruebas microbiológicas las mismas que requieren de antemano una validación secundaria para estar acorde a las exigencias internacionales y nacionales; asimismo comprobar la fiabilidad bajo condiciones concretas de uso, así como situaciones que pudieran ocurrir cuando el uso del método sea extendido a la práctica (Curren, 1995), mediante parámetros y criterios estadísticos exigidos por la USP 40 y tener así la seguridad en la detección de posibles microorganismos que podrían llegar a afectar la salud de los consumidores.

Para la realización de esta verificación se deberá tener en cuenta diferentes procedimientos a seguir, como lo son la estandarización, documentación y verificación de las metodologías microbiológicas que se realizan dentro del laboratorio de análisis microbiológico LABFARVE, con el fin de corroborar si estas metodologías cumplen con los parámetros establecidos por la USP (40).

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. MARCO LEGAL

3.1.1. Resolución Número 3028 de 2008 (13 de agosto) MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL

La presente resolución tiene por objeto definir las áreas técnicas de producción de los establecimientos farmacéuticos y aplica a todos aquellos fabricantes de medicamentos, nacionales o extranjeros, cuyos productos vayan a ser comercializados en el territorio colombiano (MPS, 2008)

3.1.2. Guía de normas de correcta fabricación de medicamentos de uso humano y veterinario.

Las Normas de Correcta Fabricación (NCF) se definen como “la parte de la garantía de calidad que asegura que los medicamentos son elaborados y controlados de acuerdo con las normas de calidad apropiadas para el uso al que están destinados”. En la Guía de Normas de Correcta Fabricación se publican unas directrices detalladas de acuerdo a dichos principios, que sirven de base para evaluar las solicitudes de autorización de fabricación y para las inspecciones que se llevan a cabo a los fabricantes de medicamentos. En la Guía de Normas de Correcta Fabricación se publican unas directrices detalladas de acuerdo a dichos principios, que sirven de base para evaluar las solicitudes de autorización de fabricación y para las inspecciones que se llevan a cabo a los fabricantes de medicamentos. (AEMPS, 2010).

3.1.3. Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP 40 2017. Volumen 1. Validación de procedimientos farmacopeicos.

Es una combinación de dos compendios: la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y el Formulario Nacional (NF). Contiene normas para medicamentos, formas farmacéuticas, fármacos, excipientes, productos biológicos, preparaciones farmacéuticas, dispositivos médicos, suplementos dietéticos y otros tratamientos. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos es el organismo a cargo de exigir el cumplimiento de la versión actual de las normas USP–NF considerada oficial por USP para medicamentos que se fabrican y comercializan en los Estados Unidos (USP 40, 2017).

3.1.4. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Guía de autoevaluación de BPL.

Technical Report Series, No. 957, 44th Report. Annex 1. 2010. Estas guías proporcionan recomendaciones para el sistema de gestión de calidad dentro del cual debe realizarse el análisis de los ingredientes farmacéuticos activos (API, por sus siglas en inglés), excipientes y productos farmacéuticos para demostrar que se obtienen resultados confiables. El cumplimiento de las recomendaciones

previstas en estas guías ayudará a promover la armonización internacional de prácticas de laboratorio y facilitará la cooperación entre laboratorios y el reconocimiento mutuo de los resultados (OMS, 2010).

3.1.5. COMITE DE EXPERTOS DE LA OMS EN ESPECIFICACIONES PARA LAS PREPARACIONES FARMACÉUTICAS INFORME 32 DE LA OMS.

Serie de informes Técnicos. 32 informe 1992. El informe indicaba claramente que la Farmacopea Internacional desempeña un papel fundamental en la definición de las especificaciones de los productos farmacéuticos. También es una herramienta valiosa en la garantía de la calidad de los productos importados. Se sugirió que se alentase a los fabricantes de los países exportadores a que incluyesen en la información del producto una indicación del cumplimiento de la Farmacopea Internacional siempre que fuera apropiado, para que los países en desarrollo pudiesen verificar más fácilmente la calidad de los productos importados (OMS, 1992).

3.2. MARCO TEÓRICO

3.2.1. Generalidades de validación

La validación constituye una condición imprescindible para las buenas prácticas de laboratorio, conforme lo establecen los distintos organismos de control y la determinación de la incertidumbre debe formar parte de este proceso de validación, esto a su vez es de vital importancia para la mejora continua de la calidad. Es necesario saber que no existe un modelo único para validación, y que los parámetros a evaluar cambian de acuerdo con los requerimientos legales de los diferentes entes y de los requerimientos analíticos particulares; se recomienda el seguimiento de una guía general para la validación de los métodos analíticos, de acuerdo con modelos aceptados internacionalmente (Otálora A, Ortiz J, *et al.*, 2005). La validación dentro de las normas establecidas garantiza la seguridad de un producto, permitiendo obtener una documentación confiable y segura, también permite obtener optimización y estandarización de los procesos, reducir costos y probabilidad de fallas (Medina & Quintana, 2002).

3.2.1.1. Validación

Consiste en establecer evidencia documentada que proporciona un grado de aseguramiento de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados (FDA, 2004). Es un proceso que ofrece evidencia de que un método es capaz de servir para su propósito planeado, es decir para detectar o cuantificar un grupo microbiano o microorganismo con adecuada precisión y exactitud (GTC 84, 2003).

La validación en sus métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales del “ensayo”. Para lograr dicho propósito se pueden utilizar muestras o productos en su forma natural, o muestras inoculadas previamente con concentraciones conocidas de microorganismos (ENAC, 2002).

- **Métodos de ensayo microbiológicos cualitativos**, tales como los que el resultado se expresa en términos de presencia/ausencia, y los procedimientos de confirmación e identificación, deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, su especificidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, límite de detección, efecto matricial, repetitividad y reproducibilidad (ENAC, 2002).
- **Métodos de ensayo microbiológicos cuantificables**, se debe conocer la especificidad, sensibilidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad, reproducibilidad y el límite de cuantificación dentro de una variabilidad establecida y, en caso necesario, determinar cuantitativamente estos parámetros. Las diferencias debidas a las matrices deben tenerse en cuenta al analizar diferentes tipos de muestras. Los resultados deben evaluarse utilizando métodos estadísticos apropiados (ENAC, 2002).

Para validar un proceso se deben realizar sistemáticamente los procedimientos de puesta a punto del mismo, mediante el seguimiento de las siguientes fases:

- **Planificación:** Se busca establecer programas temporales y listas de verificación, protocolos de la validación con criterios de aceptación/rechazo, necesidades de recursos, análisis de riesgos, etc. (Padilla J, 2007)
- **Calificación del diseño:** El primer elemento de la validación es la evaluación de nuevas instalaciones, sistemas o equipos. Se deberá demostrar y documentar la adecuación del diseño a las normas de correcta fabricación (Padilla J, 2007).
- **Calificación de la instalación:** Busca establecer por evidencia objetiva que todos los aspectos claves del equipo de proceso y la instalación sistemas auxiliares cumplan con las especificaciones aprobadas del fabricante y las recomendaciones del abastecedor del equipo para el correcto funcionamiento, y las exigencias de mantenimiento de este. Además de esto, también se incluyen requisitos de calibración y verificación de los materiales de construcción (Padilla J, 2007).

- **Calificación del funcionamiento:** Esta calificación deberá realizarse tras la calificación de la instalación, y busca establecer por medio de evidencia objetiva los límites de control de proceso y los niveles de acción que resultan en un producto que cumpla con todos los requerimientos predeterminados (Padilla J, 2007).

Debe incluir:

- a) Ensayos que hayan desarrollado especialistas con conocimiento sobre procesos, sistemas y equipos.
 - b) Ensayos que incluyan una situación o un conjunto de ellas que abarquen los límites máximos y mínimos de trabajo, condiciones denominadas como frecuencia "caso más desfavorable"
- La finalización de forma satisfactoria de la calificación del funcionamiento permitirá terminar los procedimientos de calibración, fabricación y limpieza, la formación del operario y las exigencias de mantenimiento preventivo. Así, permitirá la aprobación formal de las instalaciones sistemas y equipos (Padilla J, 2007).
 - **Calificación de desempeño:** La calificación de desempeño deberá efectuarse una vez realizadas satisfactoriamente la calificación de la instalación y de funcionamiento. Esta proveerá evidencia documentada, bajo condiciones anticipadas, que se produce de manera consistente un producto que cumpla con las especificaciones y el criterio de diseño (Padilla J, 2007).

La calificación de la ejecución del proceso incluirá, entre otras cosas, lo siguiente:

- a) Ensayos, empleando materiales de producción (o componentes sustitutivos calificados y/o simulaciones de productos), que se hayan desarrollado a partir del conocimiento especializado sobre los procesos y las instalaciones, sistemas o equipos.
- b) Ensayos que incluyan una situación o un conjunto de ellas que abarquen los límites máximos y mínimos de funcionamiento (Padilla J, 2007).

3.2.2. Validación primaria.

La validación primaria se basa en un proceso exploratorio con la meta de establecer límites operacionales y características de desempeño de un método nuevo, modificado o caracterizado de forma inadecuada. Se debe generar especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir reseña

detallada y precisa del objeto de interés (colonia positiva, tubo o placa), los laboratorios que desarrollan métodos en “casa” o una variante de una norma, deben realizar los pasó de la validación primaria (GTC 84, 2003).

3.2.3. Validación secundaria.

La validación secundaria o también llamada verificación, tiene lugar cuando un laboratorio, implementa un método desarrollado en otra parte, este tipo de validación se centra en reunir evidencias acerca de que el laboratorio está en la capacidad de cumplir con las especificaciones exigidas en la validación primaria. Normalmente, la validación secundaria emplea formas seleccionadas y simplificadas de los mismos procedimientos empleados en la validación primaria, aunque posiblemente se debe extender por un tiempo mayor. Las muestras naturales constituyen el material de ensayo óptimo y el trabajo solo requiere tratar el procedimiento dentro de los límites operacionales establecidos por la validación primaria (GTC 84, 2003).

3.2.4. Tipos de validación.

3.2.4.1. Validación prospectiva

Este tipo de validación se basa en la información que se obtiene antes de implementar el proceso de validación. Se realiza durante la etapa de ejecución, mediante un análisis de riesgos del proceso de producción, que se decide en pasos individuales, estos se evalúan entonces a la luz de la experiencia para determinar si podían conducir a situaciones críticas; se investigan posibles causas y se determina la probabilidad de que suceda y su magnitud, se trazan los planes de ensayo y se fijan las prioridades, a continuación se efectúan y se evalúan los ensayos y se realiza una valoración general; si los resultados son aceptables al final, el proceso es satisfactorio. Los procesos no satisfactorios se tienen que modificar y mejorar hasta que una nueva validación demuestre su carácter satisfactorio. Este tipo de validación es importante para limitar el riesgo de errores que se producen a escala de producción (Cortes, 2002).

3.2.4.2. Validación concurrente.

La información que es requerida en este tipo de validación se obtiene en el transcurso del mismo proceso. Es importante tener en cuenta el monitoreo constante del proceso las variables críticas, para así demostrar que el proceso está bajo control y el registro de datos sobre la marcha del proceso productivo. Sin embargo, cada aproximación trae sus características y restricciones, y por lo tanto, antes de ejecutar una validación se debe evaluar el tipo de validación a escoger, esto con el fin de obtener mejor información sobre la seguridad y la estabilidad del proceso (García E, 2001).

3.2.4.3 Validación retrospectiva.

En este tipo de validación se debe llevar a cabo una profunda revisión y análisis de la información histórica del proceso. Después de la recolección y hacer una selección de la información, se determinará la reproducibilidad de dicho proceso. Por consiguiente, para la obtención de información no es necesario ejecutar ensayos analíticos, o supervisión del proceso de manera rigurosa (Galeano N, 2007). Se requiere de una serie de pasos que están inmersos en este tipo de validación, como la preparación de un protocolo específico, el reporte de los resultados de los datos analizados. Dentro de este tipo de validación se hace necesario tener un control de los insumos, control de ambientes, equipos, controles microbiológicos, métodos analíticos, procedimientos y especificaciones. Esta validación se realiza para productos que se encuentran en el comercio que conllevan a unas conclusiones y recomendaciones (Padilla J, 2007).

3.2.4.4. Revalidación.

Es la repetición de un procedimiento de validación o una parte del mismo. Esto no significa que el programa original con el que se validó debe ser repetido. Se aplica solo cuando se presenta cambio de uno de los componentes críticos de formulación, cambios o remplazos de una pieza crítica en un equipo o sistema, cambio de las locaciones, cambio en el tamaño del lote de fabricación y por producción de unidades fuera de las especificaciones en los lotes consecutivos recomendados. La revalidación periódica se presenta cuando los procesos experimentan cambios graduales, incluso si el personal capacitado trabaja correctamente ejecutando los métodos establecidos. De manera similar el desgaste del equipo puede ocasionar cambios graduales. Por ende, es aconsejable realizar un proceso de revalidación en interludios programados, incluso si incluir cambios deliberados. Antes de decidir si implementar una revalidación, se debe realizar un examen de los datos históricos, es decir datos que fueron producidos durante las pruebas del proceso de fabricación y el producto terminado efectuadas después de la validación más reciente, esto con el objetivo de verificar si el proceso está bajo control recomendaciones (Padilla J, 2007).

3.2.5. Parámetros analíticos del proceso de Validación.

Los parámetros de rendimiento se establecen de acuerdo a la categoría a la que pertenece el método y siguiendo los requisitos exigidos por los diferentes organismos internacionales que incluyen linealidad, intervalo de trabajo, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, repetitividad, exactitud, reproducibilidad, robustez, incertidumbre, entre otros. Está implícito que los estudios para determinar los parámetros de rendimiento se llevan a cabo mediante equipos que cumplan con las especificaciones, que estén funcionando

correctamente y estén calibrados correctamente. Al igual las personas que realizan el estudio deben ser idónea en el área de trabajo en estudio, debe contar con el conocimiento adecuado respecto al trabajo, esto con el fin de que pueda tomar decisiones correctas a partir de las observaciones realizadas a medida que transcurre el estudio (Otálora A, Ortiz J, *et al.*, 2005).

3.2.5.1 Límite de detección.

Es la concentración mínima del analito que puede ser detectado en una matriz, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas. El límite de detección es un número, expresado en unidades de concentración que describe el más bajo nivel de cantidad de una sustancia que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco (Otálora A, Ortiz J, *et al.*, 2005).

3.2.5.2. Límite de cuantificación.

Es la menor concentración real a la cual el analito es detectado con confiabilidad, bajo condiciones específicas (Velandia J, 2008).

3.2.5.3. Exactitud.

Se puede definir con la cercanía de un resultado al valor verdadero por comparación con un valor de referencia. Los valores de referencia deben ser trazables a las normativas internacionales. Usualmente, la exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación de los microorganismos mediante el método de validación (Velandia J, 2008).

3.2.5.4. Especificidad.

Capacidad de un método para diferenciar específicamente el compuesto de interés, analito/parámetro, en presencia de otros componentes que se encuentren en la muestra. La especificidad puede ser afectada por la presencia de interferentes, estos componentes pueden ser precursores de las síntesis o subproductos de la misma, impurezas, excipientes o productos de degradación (Velandia J, 2008). Por otro lado, también se puede definir como la fracción de la cantidad total de células o colonias correctamente asignada en la presunta inspección (GTC 84, 2003).

3.2.5.5. Selectividad.

Es la disposición de un método a producir resultados exactos para los diferentes analitos de interés, o cuando diversos microorganismos pertenecientes al mismo grupo deben ser detectados por el método (Velandia J, 2008).

3.2.5.6. Precisión.

Grado de correlación entre los resultados de las pruebas individuales cuando se ejecuta el método repetidamente a muestras separadas e idénticas, obtenidas a partir del mismo lote del material homogéneo (Velandia J, 2008).

3.2.5.7. Robustez.

Disposición de un procedimiento analítico de no ser afectado o no cambiar sus resultados, debido a pequeñas variaciones en los parámetros de método; esto permite obtener información de su confiabilidad en condiciones de uso estandarizadas (GTC 84, 2003).

La validación de métodos analíticos para ensayos químicos sigue parámetros bien establecidos. La Validación de métodos microbiológicos comparte algunas de las mismas preocupaciones, aunque debe tenerse en cuenta la naturaleza única de ensayos microbiológicos. En la Tabla 1 se describe los parámetros estadísticos que se requieren en un estudio de verificación.

Tabla 1. Parámetros de validación por tipo de prueba microbiológica.

Parámetros Cuantitativos	<ul style="list-style-type: none">• Exactitud• Precisión• Especificidad• Resistencia
Parámetros Cualitativos	<ul style="list-style-type: none">• Sensibilidad• Especificidad• Exactitud relativa• Tasa falso positivos• Tasa falsos negativos• Eficiencia• Selectividad• Concordancia estadística para métodos cualitativos

Tabla 2. Expresiones de Parámetros de validación y su cálculo.

Sensibilidad	$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$ <p>Expresado como % $\text{Sensibilidad \%} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$</p>
Especificidad	$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$

	<i>Expresado como %</i> <i>Especificidad %</i> = $\frac{VN}{VN + FP} \times 100$
Exactitud relativa	<i>Exactitud relativa</i> = $\frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN} \times 100$
Tasa falso positivos	<i>Tasa falsos positivos</i> = $\frac{FP}{FP + VP} = 1 - \text{Especificidad}$ <i>Expresado en %</i> <i>Falsos positivos %</i> = $\frac{FP}{FP + VP} \times 100 = 100 - \text{Sensibilidad}$
Tasa falsos negativos	<i>Tasa falsos negativos</i> = $\frac{FN}{FN + VN}$
Eficiencia	<i>Eficiencia</i> = $\frac{VP + VN}{n}$
Selectividad	<i>Selectividad</i> = $\text{Log} \left[\frac{(VP + FP)}{n} \right]$
Concordancia estadística para métodos cualitativos	INDICE DE CONCORDANCIA KAPPA: $KAPPA = 2 (VP \times VN - FN \times FP) / [(VP + FP)(FP + VN) + (VP + FN)(FN + VN)]$

3.2.6. Técnicas para la validación

Para la validación es conveniente utilizar una o varias de las técnicas siguientes para la determinación del desempeño de un método:

- ✓ Contaminación de muestras artificialmente. La validación de métodos microbiológicos debe ser reflejo de las condiciones de ensayo reales. Esto se puede conseguir utilizando muestras contaminadas naturalmente o muestras contaminadas o fortificadas a un determinado nivel. En general, el proceso consiste en la preparación de una muestra agregando el material interferente a una muestra real que contenga el material a ensayar. Una segunda alícuota de la muestra original se diluye con un solvente, y ambas se analizan determinándose la diferencia entre ambas.
- ✓ Uso de materiales de referencia o materiales de referencia certificados. Esta alternativa tiene algunos inconvenientes como el elevado coste económico, la posibilidad y facilidad de encontrar un material de referencia suficientemente representativo de la muestra a validar.

- ✓ Comparación de resultados obtenidos con otros métodos alternativos. Se analizan muestras de pacientes por el método en estudio y otro método de comparación, luego se estima el error sistemático basándose en las diferencias observadas entre ambos métodos. El método de comparación debería ser, en la medida de lo posible, el de referencia (gold standard).
- ✓ Comparaciones Inter laboratorios (validación por pares de valores). La validación por pares de valores es aplicable cuando no es posible utilizar ninguno de los métodos anteriores, es decir, no es posible realizar contaminación artificial de las muestras, no se puede disponer de muestras de valor de referencia estable, o cuando siéndolo no se disponga de cantidad suficiente. Esta sistemática se basa en la utilización de resultados de intercomparaciones en las que haya participado el laboratorio, y utilizar estos datos como valores de referencia.

3.3. ANTECEDENTES

Cuando se habla de productos farmacéuticos, la calidad de estos es una característica que debe ser comprobada con procedimientos fiables y seguros, esto con la finalidad de cumplir con la legislación farmacéutica actual y exigencias farmacopeicas y para ofrecer a los clientes productos eficaces y con una alta calidad. Por esta razón la industria farmacéutica ha ido estableciendo, enriqueciendo tecnologías y metodologías que logren garantizar la calidad. Es aquí donde radica la importancia de la verificación de cualquier proceso que se vaya a realizar y se transforma en indispensable para el aseguramiento de la calidad.

Laboratorio LABFARVE cuenta con un Departamento de Aseguramiento de la Calidad que cumple con los requisitos y normas establecidas por la legislación vigente y los entes reguladores. Los procesos de fabricación están basados en las **Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)** para garantizar la calidad y pureza de todos los productos.

Además, se cuenta con personal profesional y técnico competente que verifica y controla todas las fases de producción, desde la llegada de las materias primas como planta fresca, proveniente de cultivos orgánicos certificados, hasta el proceso de fabricación y la entrega del producto terminado, incluyendo en el proceso los análisis físico-químicos, microbiológicos y los estudios de cromatografía requeridos, la supervisión del envasado, el etiquetado y el almacenamiento y resguardo de los productos en Bodega.

Para Laboratorio LABFARVE la calidad es el valor más importante y es el que lo distingue de la competencia ya que les asegura a los clientes que están recibiendo un producto de la más alta calidad y pureza.

La industria farmacéutica es, a nivel mundial, una de las industrias que se encuentran en constante desarrollo y que se rige por normas nacionales e internacionales en actividades de manufactura y de control de procesos. Según la ley sólo se podrá inscribir o reinscribir en el Registro Sanitario de medicamentos las fórmulas farmacéuticas señaladas en determinadas obras, en sus últimas ediciones y suplementos entre ellas se encuentra “United States Pharmacopea” (USP 40), en la cual se señala que las empresas farmacéuticas deben implementar métodos de control para el proceso de producción, acorde con los requerimientos internacionales actuales, los cuales tienen que pasar por un proceso de validación, definida como la confirmación mediante el suministro de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista, demostrando la fiabilidad del método, requisito primordial cuando deseamos obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables (L&S Consultores, 2003). Cuando se toma un método normalizado, éste ya se encuentra validado, pero es necesario realizar una validación secundaria cuyo propósito es establecer que el método satisfaga realmente las necesidades del laboratorio (Sueros G, 2013).

4. METODOLOGÍA

4.1. MATRIZ DE SELECCIÓN DE PRODUCTOS PARA VERIFICACIÓN DE METODOLOGÍAS MICROBIOLÓGICAS

Para la verificación de las metodologías microbiológicas se seleccionaron diferentes productos de la línea de Fitoterapéuticos elaborados en laboratorios **LABFARVE** según la matriz de selección establecida. Se seleccionaron aquellos productos con mayor ponderación.

Se tuvo en cuenta los siguientes parámetros:

1. Frecuencia de fabricación de los lotes de cada producto en un año.
2. pH producto terminado.
3. Recuento microbiológico para Aerobios Mesófilos y Mohos y Levaduras (Expresado en Unidades logarítmicas).

Para dichos parámetros se estableció una escala de 1 a 3 en frecuencia, pH y recuentos microbiológicos con los siguientes criterios:

Table 3. Parámetros establecidos para la matriz de producto.

Frecuencia	1	0 - 5 Lotes cada año
	2	6 - 11 Lotes cada año
	3	12 - 18 Lotes cada año
pH	1	9,1 - 11 Básico
	2	6,6 - 9 Neutro
	3	4 - 6 Ácido
Recuentos microbiológicos para Aerobios Mesófilos y Mohos y Levaduras	1	3,30 - 3,47
	2	3,0 - 3,29
	3	1 - 2,99

4.2. EQUIPOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Durante el procedimiento de verificación de las metodologías microbiológicas se tuvo en cuenta que los equipos a ser utilizados durante el proceso contarán con los certificados de calificación de instalación, calibración, calificación de desempeño y calificación operacional cumpliendo con el cronograma establecido por la empresa en el documento FO-A05-A052-3 LABFARVE CRONOGRAMA DE MANTENIMIENTOS PREVENTIVOS DE MAQUINAS Y EQUIPOS CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLOGIA.

Tabla 4. Códigos de los Equipos del Laboratorio de Microbiología.

CODIGO	MAQUINA/EQUIPO	UBICACIÓN
381	Sistema de aire ambiente microbiología	Piso técnico Microbiología
404	Cámara de estabilidad a largo plazo	Área Cabinas de estabilidad
405	Cámara de estabilidad acelerada	Área Cabinas de estabilidad
406	Nevera LG	Área Preparación de medios de cultivo
407	Nevera Challenger	Área Manejo de sepas
408	Incubadora Binder bacterias 35 °C	Área Incubación y lectura
409	Incubadora BINDER 42°C	Área Incubación y Lectura
410	Autoclave Sterilof	Área Preparación de medios de cultivo
411	Autoclave All American	Área Esterilización y lavado de material de desecho
412	Cabina de bioseguridad	Área Manejo de Cepas
414	Pipeteador electrónico	Área Análisi de muestras
415	Baño maría	Área Cepas
419	Cabina de extracción de vapores	Área Análisis de muestras
421	Termómetro digital tepcel	Área Incubación y lectura
423	Micropipeta Brand P1000	Área Análisis de muestras
429	Incubadora Binder Mohos y Levaduras 25 °C	Área Incubación y lectura
435	Microscopio	Área Incubación y lectura
436	Cuenta colonias	Área Incubación y lectura
682	Horno de secado BINDER	Área Preparación de medios de cultivo
460	Balanza digital 2100 g B003	Área Análisis de muestras
467	Balanza triple brazo 087	Área Preparación de medios de cultivo
679	Agitador Vortex	Área Manejo de Cepas
634	Baño serológico	Área Análisis de muestras
	Baño serológico	Área Manejo Cepas
638	Cabina de flujo laminar	Área Análisis de muestras
663	Plancha de calentamiento	Área Preparación de medios de cultivo
664	Micropipeta brand P100	Área Cepas

4.3. CONTROLES DEL LABORATORIO

4.3.1. Control microbiológico de ambientes

Teniendo en cuenta que el laboratorio de Microbiología cuenta con áreas tipo C y tipo B, los controles de ambientes se desarrollaron teniendo en cuenta el instructivo IN-O10-33 ANALISIS MICROBIOLOGICO DEL AMBIENTE O AIRE DEL PROCESO. Mediante la técnica de sedimentación en placa, se colocaron cajas de Petri con medios TSA Medio para Aerobios Mesófilos, Medio Sabouraud para Mohos y Levaduras, en las siguientes Áreas:

- Área de Cepas
- Área de Analisis de Muestras
- Área de Incubación y lectura
- Área de Esterilización y lavado del material de desecho
- Área de Preparación de Medios
- Área de Oficina
- Área de Aseo
- Área de Insumos
- Área Muestreoteca

Los medios fueron expuestos por un tiempo de 4 horas y posteriormente se incubaron a 37°C por 72 horas para el recuento de Aerobios Mesofilos y para el recuento de Mohos y Levaduras 5 días a temperatura 22°C. Estos controles se realizaron una vez por semana y los resultados se registraron en el formato FO-O10-343 RECUENTO MICROBIOLOGICO DE LOS AMBIENTES DE LA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE FITOTERAPEUTICOS UNA VEZ A LA SEMANA.

4.3.2. Control microbiológico de las superficies

El control microbiológico se realizó teniendo en cuenta el instructivo IN-O10-42 ANALISIS MICROBIOLOGICO DE EQUIPOS Y DE SUPERFICIES DEL PROCESO en el cual se establece la técnica de hisopado en un diámetro de 25 cm² en 10mL utilizando Caldo Base de Caseina Lecitina Polisorbato como diluyente, se hizo un barrido a un área delimitada de 100 cm² en las áreas anteriormente mencionados. Se realizó recuentos de Aerobios Mesofilos Agar TSA tiempo de incubación 72 horas temperatura 30°C - 35°C, Recuento de Coliformes Totales y Coliformes Fecales en Agar VRA con MUG tiempo de incubación 72 horas temperatura 30°C – 35°C y Recuento de Mohos y Levaduras Agar Sabouraud tiempo de incubación 5 días temperatura 20°C - 25°C. Los análisis se realizaron una vez por semana y los resultados se registraron en el formato FO-O10-297 RECUENTO MICROBIOLOGICO DE LAS SUPERFICIES DE LA PLANTA DE PRODUCCION DE FITOTERAPEUTICOS.

4.3.3. Control de humedad y temperatura

Los controles de humedad y temperatura se tomaron teniendo en cuenta el instructivo IN-E20-E201-11 CONDICIONES AMBIENTALES EN AREAS DE PRODUCCION, ACONDICIONAMIENTO, CODIFICADO, BODEGAS Y CONTROL DE CALIDAD. Las diferentes áreas del Laboratorio de microbiología cuentan con Higrómetros marca BRIXCO, estas mediciones se registraron 2 veces al día mañana y tarde en el formato de FO-E20-1 CONTROL DE HUMEDAD Y TEMPERATURA.

4.3.4. Control de limpieza y desinfección de áreas y equipos

La limpieza y desinfección de las diferentes áreas y equipos del laboratorio se desarrolló teniendo en cuenta lo establecido en el instructivo IN-O10-20 LIMPIEZA Y DESINFECCION DE LAS AREAS Y EQUIPOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. El detergente y los desinfectantes utilizados en el laboratorio son: el Extran al 3% para equipos y Extran 1.5% para el material de vidrio y alcohol y Glutfar Plus como desinfectantes; los desinfectantes utilizados para las áreas son el Hipoclorito de Sodio al 0.1% y el Quiruger Plus. Estas actividades fueron registradas en el formato de FO-O10-288 CONTROL DE LIMPIEZA Y DESINFECCION DE LAS AREAS, SUPERFICIES Y EQUIPOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. Después de realizada la limpieza y desinfección de las cabinas se aplicó Luz Ultravioleta, este procedimiento se registró en el formato FO-O10-348 REGISTRO DE LAMPARA LUZ ULTRA VIOLETA DE LAS CABINAS DE MICROBIOLOGÍA.

4.3.5. Control de preparación de medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo se tuvo en cuenta el procedimiento establecido en el instructivo IN-O10-15 PREPARACION Y ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO USADOS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. Los datos de la preparación se registraron en el formato FO-O10-245 REGISTRO, PREPARACION Y CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

4.3.6. Control de temperaturas de los equipos de microbiología

Se realizó el control de las temperaturas teniendo en cuenta el procedimiento establecido en el instructivo IN-A05-A052-12 CUIDADOS Y MANEJO DEL TERMOMETRO DIGITAL TEPCEL de todos los equipos que se registran en la Tabla 4 y que en su defecto lo requieren. Las temperaturas se registraron en los siguientes formatos:

- FO-E20-16 REGISTRO DE TEMPERATURAS DE LA INCUBADORA BINDER HONGOS Y LEVADURAS 25°C, FO-E20-17 REGISTRO DE TEMPERATURAS NEVERA REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO
- IN-E20-18 REGISTRO Y CONTROL DE LAS TEMPERATURAS DE LOS EQUIPOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

- FO-E20-20 REGISTRO DE TEMPERATURAS DE LA INCUBADORA MEMMERT
- FO-E20-19 REGISTRO DE TEMPERATURAS NEVERA CEPARIO
- FO-E20-21 REGISTRO DE TEMPERATURAS DE LA INCUBADORA BINDER BACTERIAS 35 °C
- FO-E20-32 REGISTRO DE TEMPERATURAS NEVERA (CONGELADOR) CEPARIO.

4.3.7. Control de residuos de detergente y lavado y esterilización del material de vidrio

Durante el proceso de verificación de los métodos microbiológicos se tuvo en cuenta los controles de residuos de detergente según el procedimiento establecido en el instructivo IN-O10-18 LAVADO Y DESINFECCION DEL MATERIAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA, el control de lavado y esterilización según los establecido en el instructivo IN-O10-17 ESTERILIZACION DEL MATERIAL LIMPIO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. Los resultados de residuos de detergente se registraron en el formato de FO-O10-246 CONTROL DE VERIFICACION CUALITATIVA DE RESIDUOS DE DETERGENTE EN EL MATERIAL DE VIDRIO y los resultados de la verificación de los ciclos de esterilización se registraron en el formato FO-O10-392 VERIFICACION DE ESTERILIZACION.

4.3.8. Control durante la siembra

Durante los diferentes análisis realizados se llevó acabo el control microbiológico del ambiente de la cabina de Bioseguridad, los controles realizados corresponden al recuento de aerobios Mesófilos y el recuento de Mohos y Levaduras, los resultados se registraron en el formato FO-O10-187 CONTROL MICROBIOLOGICO DURANTE LA SIEMBRA DE LAS MUESTRAS. Adicionalmente se realizó el control de los medios de cultivo preparados para ser utilizados en los diferentes análisis, los resultados se registraron en el formato FO-O10-186 CONTROL MICROBIOLOGICO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ANALISIS DE LAS MUESTRAS.

4.4. METODOLOGIAS ESTABLECIDAS PARA EL ANÁLISIS RUTINARIO DE MATERIAS PRIMAS, MATERIAS PRIMAS VEGETALES, MATERIAL DE ENVASE Y EMPAQUE Y PRODUCTO TERMINADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

Teniendo en cuenta que los medios de cultivo que van hacer utilizados deben estar previamente aprobados, por ende, se realizó las pruebas de promoción de crecimiento de los medios de cultivo.

4.4.1. Promoción de crecimiento de los medios de cultivo

Los medios de cultivos deshidratados que se utilizaron durante el proceso de verificación de los métodos microbiológicos fueron previamente sometidos a las pruebas de promoción de crecimiento según el instructivo IN-O10-48 PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA EFECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA y los datos se registraron en los formatos FO-O10-250 PRUEBAS DE PROMOCION DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO y FO-O10-251 RESULTADOS PRUEBAS INDICADORA E INHIBITORIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO. Una vez cumplieron con los parámetros establecidos para su posterior uso se identificaron con el rótulo FO-O10-243 ROTULO DE CERTIFICADO DE ANALISIS DEL MEDIO DE CULTIVO.

Tabla 5. Medios de Cultivo Deshidratados.

MEDIOS DE CULTIVO	MICROORGANISMO	LOTE	MARCA
Caldo Base de Caseína Lecitina Polisorbato	<p><i>Salmonella enterica subsp. Entérica serovar typhimurium</i> ATCC® 14028. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus.</i> 10 – 100 UFC x 0.1 mL. ATCC® 6538. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i> ATCC® 6633. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC® 9027. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC® 10231. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p>	106668	SCHARLAU
Caldo Trypticasa de Soya	<p><i>Salmonella enterica subsp. Entérica serovar typhimurium</i> ATCC® 14028. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus.</i> 10 – 100 UFC x 0.1 mL. ATCC® 6538. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i> ATCC® 6633. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC® 9027. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC® 10231. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p> <p><i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p>	106909	SCHARLAU
Caldo Rappaport Vassiliadis	<p><i>Salmonella enterica subsp. Entérica serovar typhimurium</i> ATCC® 14028. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.</p>	106645	SCHARLAU

Caldo MacConkey	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	975106	REMEL
Agar Tripticasa de Soya	<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i> ATCC® 6633. 10 – 100 UFC x 0.1 mL	2207249	OXOID
Agar Sabouraud	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	2216269	OXOID
Agar VRBA con MUG	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	2285698	OXOID
Agar Salado Manitol	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC® 6538. 10 – 100 UFC x 0.1 mL	2196048	OXOID
Agar Cetrimide	<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC® 9027. 10 – 100 UFC x 0.1 mL	2216119	OXOID
Agar XLD	<i>Salmonella enterica subsp. Entérica serovar typhimurium</i> ATCC® 14028. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	1928721	OXOID

4.5. CEPAS CUANTIFICABLES DE REFERENCIA

Para la verificación de las metodologías microbiológicas se emplearon cepas cuantificables de referencia EZ-Accu Shot™ que son preparaciones enumeradas liofilizadas. Cuando se procesan según las instrucciones, estas preparaciones proporcionan una concentración de provocación de entre 10 y 100 UFC por cada 0,1 ml en medios. Estas preparaciones de microorganismos son trazables a la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC®).

4.5.1. Procedimiento de uso de cepas EZ-ACCU SHOT™

Las cepas EZ-ACCU SHOT™ se manipularon según lo establecido en el manual MA-O10-1 MANUAL DEL MANEJO DE CEPAS EZ-ACCU SHOT™ MICROBIOLOGICS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. Se tuvo en cuenta los diferentes controles establecidos en el registro FO-O10-248 REGISTRO DE CONTROL DE VIABILIDAD DE CEPAS DE TRABAJO LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA, FO-O10-247 CONTROL DE CEPAS DE REFERENCIA, FO-O10-249 REGISTRO DE CONTROL DE CEPAS DE TRABAJO LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

Los kits de EZ-ACCU SHOT™ incluyen: 5 frascos de un solo microorganismo enumerado (1 gránulo liofilizado por frasco), 5 frascos de líquido hidratante (de 1,2 ml cada uno) y un certificado de ensayo desprendible.

Figura 1. Activación de cepas cuantificables.





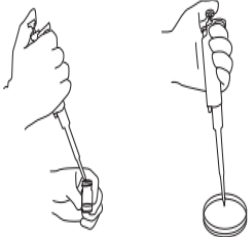







<p>1. Retire del almacenamiento refrigerado 1 frasco de líquido hidratante y 1 bolsa de papel aluminio con el gránulo liofilizado. Antes de abrir el frasco de líquido hidratante y la bolsa de aluminio, espere aproximadamente 30 minutos hasta que los materiales alcancen la temperatura ambiente.</p>	
<p>2. Abra la bolsa de papel aluminio y retire el frasco con un gránulo liofilizado.</p>	
<p>3. Retire la tapa del frasco con el gránulo y la del frasco de líquido hidratante. Con una pinza, transfiera 1 gránulo al frasco de líquido hidratante de 1,2 ml. Se debe utilizar solo un gránulo para obtener una concentración de provocación de entre 10 y 100 CFU por cada 0,1 ml en medios no selectivos. Vuelva a tapar el frasco de líquido hidratante inmediatamente.</p>	
<p>4. Agite el material hidratado con un agitador vórtex hasta que el gránulo se disuelva completamente y la suspensión sea homogénea.</p>	
<p>5. Con una pipeta estéril, transfiera 0,1 ml de la suspensión hidratada al material que se someterá a la provocación (la suspensión contiene entre 10 y 100 CFU por cada 0,1 ml). Nota: la suspensión restante puede refrigerarse y utilizarse dentro de las 8 horas, excepto los productos con número de catálogo 0484A, que deben utilizarse dentro de los 30 minutos. Somete la suspensión al ensayo inmediatamente después de retirarla del refrigerador.</p>	
<p>6. Avance con el procedimiento de provocación según el protocolo del laboratorio. Si planea volver a utilizar la suspensión, refrigérela a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. Deseche cualquier material hidratado restante según el protocolo del laboratorio para la eliminación de materiales de riesgo biológico.</p>	

Tabla 6. Cepas que se utilizaron en las Verificación de los métodos Microbiológicos.

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO	MARCA	
0485 ^a	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC® 6538. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	MICROBIOLOGICS	
0483 ^a	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	MICROBIOLOGICS	
0484 ^a	<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC® 9027. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	MICROBIOLOGICS	
0443 ^a	<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	MICROBIOLOGICS	
0392 ^a	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	MICROBIOLOGICS	
0363 ^a	<i>Salmonella enterica subsp. Entérica</i> <i>serovar typhimurium</i> ATCC® 14028. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	MICROBIOLOGICS	
0483 ^a	<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i> ATCC® 6633. 10 – 100 UFC x 0.1 mL.	MICROBIOLOGICS	

4.6. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA

Para la dilución de las muestras a analizar se utilizó el procedimiento establecido por el laboratorio IN-O10-39 PREPARACION Y DILUCION DE LA MUESTRA, la preparación de las muestras depende de las características físicas del producto a examinar.

4.6.1. Productos solubles en agua:

Se preparó una dilución de 1 en 10 del producto a examinar en solución amortiguadora de Cloruro de Sodio- Peptona de pH 7,0, en solución amortiguadora de fosfato de pH 7,2 o en el caldo digerido de Caseína y Soja. Se ajustó a un pH de 6 a 8.

4.6.2. Productos no grasos insolubles en agua:

Se suspendió el producto a analizar (Por lo general se prepara una dilución 1 en 10) en solución amortiguadora 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 20, para favorecer la suspensión de sustancias poco humectables. Si fuera necesario, ajustar a un pH de 6 a 8. Prepara diluciones adicionales, con el mismo diluyente, si fuera necesario.

4.6.3. Productos Grasos:

Se disolvió el producto a examinar en Miristato de Isopropilo esterilizado por filtración o mezclarlo con la cantidad mínima necesaria de polisorbato 20 esterilizado por filtración o mezclarlo con la cantidad mínima necesaria de polisorbato 20 estéril u otro reactivo tensoactivo estéril no inhibitorio que se calienta, si fuera necesario, a no más de 40°C o, en caso excepcionales, a no más de 45°C. Se mezcló cuidadosamente y se mantuvo la temperatura en baño de agua.

4.7. EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES: PRUEBAS DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS.

Para realizar las pruebas de los microorganismos específicos en productos no esteriles se emplearon las metodologías establecidas en USP 38.

4.7.1 Método recuento de Aerobios Mesófilos

El procedimiento se encuentra establecido en el instructivo IN-O10-34 RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS.

Procedimiento

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados tal como se describe en el procedimiento IN-O10-39 PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA.
- Se transfirió 1 mL de la dilución en profundidad en una caja de Petri estéril.
- Se vertió en la caja de Petri de 15 a 20 mL de Agar Tripticasa de Soya, fundido y mantenido a 45°C.
- Se mezcló el inóculo con el medio de cultivo servido.
- Se sirvió un control de esterilidad del medio de cultivo incubando una caja que contenía Agar Tripticasa de Soya.
- Se invirtió las placas e incubó a 30°C - 35°C durante un periodo de 3 a 5 días.

Lectura de resultados

- Se contaron las colonias por caja y se multiplicó por el factor de dilución según el procedimiento de Recuentos de Microorganismos IN-O10-14 RECUENTO DE MICROORGANISMOS.
- Se registró los resultados de los análisis de las muestras en el formato FO-O10-181 REGISTRO DE MUESTRAS.
- Se registró los resultados de los controles negativos en el formato de Registro de Preparación y Control de Medios de cultivo FO-O10-245 REGISTRO, PREPARACIÓN Y CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA y los ambientes de la cabina de Flujo Laminar durante la siembra en el formato FO-O10-187 CONTROL MICROBIOLÓGICO DURANTE LA SIEMBRA DE LAS MUESTRAS.

4.7.2. Método recuento en placa de Coliformes Totales y/o *Escherichia coli*.

EL procedimiento se encuentra establecido en el instructivo IN-O10-36 RECUESTO EN PLACA DE COLIFORMES TOTALES Y/O *Escherichia coli*.

Procedimiento

- Se preparó Agar VRBA con MUG como indica la Tabla FO-O10-324 PREPARACIÓN AGAR VRBA MUG (MARCA: OXOID)
- Se preparó la muestra según el procedimiento IN-O10-39 PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA teniendo en cuenta el tipo de producto.
- Se transfirió de 1 mL de la dilución a una caja de Petri. Se aconseja realizar varias diluciones en los casos en que no se conozca previamente el número aproximado de microorganismos presentes en el producto.
- Inmediatamente se vertió en la caja de Petri, de 15mL a 20mL de Agar VRBA con MUG, mantenido de 45°C.
- Se mezcló el inóculo con el Agar girando las cajas con movimientos de vaivén.
- Se sirvió un control de esterilidad del medio de cultivo incubando una caja que contenía Agar VRBA con MUG.
- Una vez solidificado el medio de cultivo, se invirtieron las cajas e incubaron a 35°C por 48 Horas.

Lectura y cálculo de los recuentos

- Transcurrido el tiempo de incubación se identificó las colonias que correspondían al crecimiento característico de Coliformes Totales y *E. coli* teniendo en cuenta el fundamento del medio y utilizando la Lámpara de Luz Ultra Violeta a 366 nm; se contaron las colonias por caja y se multiplicaron por el factor de dilución.
- Según el indicador del medio de cultivo en el agar VRBA con MUG, las colonias se observan así:

Coliformes: color violeta con precipitado.

***E. coli*:** color violeta con producción de fluorescencia a la luz ultravioleta.

- Se expresaron los resultados tal como se indica en el procedimiento de recuentos de microorganismos IN-O10-14 RECUESTO DE MICROORGANISMOS.
- Se registró los resultados de los análisis de las muestras en el formato de registro de muestras FO-O10-181 REGISTRO DE MUESTRAS.
- Se registró los resultados de los controles negativos en el formato de Registro de Preparación y Control de Medios de cultivo FO-O10-245 REGISTRO, PREPARACIÓN Y CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO EN

EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA y los ambientes de la cabina de bioseguridad durante la siembra en el formato FO-O10-187 CONTROL MICROBIOLÓGICO durante la siembra de las muestras.

- Una vez finalizado el recuento, se depositó en bolsas plásticas las placas para enviar a esterilización.

4.7.3. Determinación de *Salmonella* spp. por el método tradicional IN-O10-16

EL procedimiento se encuentra establecido en el instructivo IN-O10-16 DETERMINACIÓN DE *Salmonella* spp. POR EL MÉTODO TRADICIONAL

Procedimiento

El aislamiento de ***Salmonella* spp.** incluye cuatro etapas fundamentales:

Enriquecimiento no selectivo

- Se preparó la muestra en frascos que contengan 90 mL de Caldo base Caseína Lecitina Polisorbato tal como se describe en el Procedimiento IN-O10-39 PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA, homogenizar la solución.
- Se transfirió 10 mL de Caldo base caseína de Lecitina y Polisorbato a 90 mL de Caldo Tripticasa de Soya e Incubó a 35°C por 24 horas.

Enriquecimiento selectivo

- Se transfirió por duplicado 0.1 mL del cultivo obtenido del enriquecimiento no selectivo en 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis, por duplicado. Se incubó a 35°C por 18 - 24 horas.

Siembra en placas de agar selectivo y diferencial

- Se preparó las placas de Petri con Agar Cetrimide según la tabla FO-O10-321 PREPARACIÓN AGAR XLD MARCA SCHARLAU se dejó solidificar y secar la superficie de las placas. (No usar las placas con la superficie húmeda porque no se permite el crecimiento de colonias definidas se diseminan).
- Se transfirió por duplicado con la ayuda de una micropipeta 0.1 mL de Caldo Rappaport Vassidialis a las placas de Agar XLD y se realizó siembra masiva empleando Asas de Hockey estériles. Se incubó una caja de Petri del medio sin inocular en las condiciones de tiempo y temperatura respectiva, para realizar el control negativo del medio.
- Se invirtieron las placas e incubaron a de 30°C a 35°C durante 18 a 72 horas.

Tinción de Gram

- Se repicó la colonia de crecimiento característico en Agar Tripticasa de Soya e incubó a 30°C a 35°C por 24 a 48 horas para obtener un cultivo puro.
- Se realizó la tinción de Gram según el instructivo IN-O10-41 para determinar la morfología y coloración.

Lectura de resultados

- El crecimiento de Colonias de color rojo redondas, de diferente tamaño, brillantes con o sin un precipitado negro, con viraje del medio a un rosado intenso, indica la presencia presuntiva de *Salmonella* spp.
- Si el crecimiento es característico y en la tinción de Gram se observan bacilos Gram negativos, se debe repicar la colonia en Agar Tripticasa de Soya e incubar a 30°C a 35°C por 24 a 48 horas para obtener un cultivo puro y enviar al laboratorio externo calificado para identificación.
- Se reportará como Presencia o Ausencia en el formato FO-O10-181 REGISTRO DE MUESTRAS

4.7.4. Recuento de Mohos y Levaduras IN-O10-35

Procedimiento

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados tal como se ha descrito en el Procedimiento IN-O10-39 PREPARACION Y DILUCION DE LA MUESTRA.
- Se transfirió 1 mL de la dilución en profundidad en una caja de Petri estéril.
- Se vertió en la caja de Petri de 15 a 20 mL de Agar Sabouraud fundido y mantenido a 45°C.
- Se mezcló el inoculo con el medio de cultivo servido. No debe transcurrir más de 20 minutos entre la realización de la dilución y el vertido del medio.
- Una vez solidificado el medio de cultivo, se invirtió las placas y se incubó de 20°C a 25°C durante 5 a 7 días.

Lectura de resultados

- Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias por caja y se multiplicaron por el factor de dilución.
- Se registró los resultados de los análisis de las muestras en el formato de registro de muestras FO-O10-181 REGISTRO DE MUESTRAS.
- Se registró los resultados de los controles negativos del medio en el formato de Registro de Preparación y Control de Medios de cultivo FO-O10-245 REGISTRO, PREPARACIÓN Y CONTROL DE MEDIOS DE

CULTIVO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA y los ambientes de la cabina de Flujo Laminar durante la siembra en el formato FO-O10-187 CONTROL MICROBIOLÓGICO DURANTE LA SIEMBRA DE LAS MUESTRAS.

- Una vez finalizado la lectura, las placas se depositaron en bolsas plásticas para posteriormente esterilizar.

4.7.5. Procedimiento para determinar la Ausencia o Presencia de *Pseudomonas aeruginosa* IN-O10-43

EL procedimiento se encuentra establecido en el IN-O10-43 PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA AUSENCIA O PRESENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Procedimiento

El aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* incluye tres etapas fundamentales:

Enriquecimiento no selectivo

- Se preparó la muestra en frascos de contenían 90 mL de Caldo Base Caseína Lecitina y Polisorbato tal como se describe en el Procedimiento IN-O10-39 PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA, se homogenizó la solución.
- Se transfirió 10 mL de Caldo base caseína de Lecitina y Polisorbato a 90 mL de Caldo Trypticasa de Soya e Incubó a 35°C por 24 horas.

Siembra en placas de Agar selectivo y diferencial

- Se preparó las placas de Petri con Agar Cetrimide según la Tabla FO-O10-320 PREPARACIÓN AGAR CETRIMIDE MARCA MERCK.
- Se transfirió por duplicado con la ayuda de una micropipeta 0.1 mL de Caldo Trypticasa de Soya preincubado a las placas de agar Cetrimide y realizar la siembra masivamente empleando las Asas de Hockey estériles. Se debe incubar una caja de Petri del medio sin inocular en las condiciones de tiempo y temperatura respectiva, para realizar el control negativo del medio.
- Se invirtieron las placas e incubaron a 30°C a 35°C durante un periodo de 18 a 72 horas.

Tinción de Gram

- Se repicó la colonia de crecimiento característico en Agar Nutritivo o Agar Tripticasa de soya e incubó a 30°C a 35°C por 24 a 48 horas para obtener un cultivo puro.
- Se realizó la tinción de Gram según el instructivo IN-O10-41 FALTA NUEVO CÓDIGO para determinar la morfología y coloración.

Lectura de resultados

- El crecimiento de Colonias con un color ligeramente verde en la superficie del Agar Cetrimide, indica la presencia presuntiva de ***Pseudomona aeruginosa***.
- Si el crecimiento es característico y en la Tinción de Gram se observan bacilos Gram negativos, se debe repicar la colonia en Agar Tripticasa de soya e incubar a 30°C a 35°C por 24 a 48 horas para obtener un cultivo puro y enviar al laboratorio externo calificado para identificación.
- Reportar como Presencia o Ausencia en el formato FO-O10-181 REGISTRO DE MUESTRAS.

4.7.6. Procedimiento para determinar la Ausencia o Presencia de *Staphylococcus aureus* IN-O10-45

El procedimiento se encuentra establecido en el IN-O10-45 PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA AUSENCIA O PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus*

Procedimiento

El aislamiento de ***Staphylococcus aureus*** incluye tres etapas fundamentales:

Enriquecimiento no selectivo

- Se preparó la muestra en frascos que contenían 90 mL de Caldo base de Caseína Lecitina y Polisorbato tal como se describe en el Procedimiento IN-O10-39 PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA. Homogenizar la solución.
- Se transfirió 10 mL a un frasco con 90 mL de Caldo Tripticasa de Soya y se incubó de 30°C a 35°C por 18 a 24 horas.

Siembra en placa en agar selectivo y diferencial

- Se preparó las placas de Petri con Agar Manitol Salado FO-O10-333 PREPARACIÓN AGAR SALADO MANITOL (MARCA OXOID), se dejó solidificar y secar la superficie de las placas.

- Se transfirió por duplicado con la ayuda de una micropipeta 0.1 mL de Caldo Tripticasa de Soya preincubado a las placas de Agar Manitol y se realizó la siembra masivamente empleando las Asas de Hockey estériles. Se incubó una caja de Petri del medio sin inocular en las condiciones de tiempo y temperatura respectivo, para realizar el control negativo del medio.
- Se invirtieron las placas y se incubaron a de 30°C a 35°C durante 18 a 72 horas.

Tinción de Gram

- Se repicó la colonia de crecimiento característico en Agar Tripticasa de Soya y se incubó de 30°C a 35°C por 24 a 48 horas para obtener un cultivo puro.
- Se realizó la Tinción de Gram según el instructivo IN-O10-41 TINCIONES MICROBIANAS para determinar la morfología y coloración.

Lectura de resultados

- El crecimiento de Colonias amarillas o blancas rodeadas de una zona amarilla en la superficie del Agar Salado Manitol, indica la presencia presuntiva de ***Staphylococcus aureus***.
- Si el crecimiento es característico y en la Tinción de Gram se observan cocos Gram positivos, se debe repicar la colonia en Agar Tripticasa de Soya y se incuba a 30°C a 35°C de 24 a 48 horas para obtener un cultivo puro y enviar al laboratorio externo calificado para identificación.
- Reportar como Presencia o Ausencia en el formato FO-O10-181 REGISTRO DE MUESTRAS.

4.8. METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA EL PROCEDIMIENTO DE VERIFICACIÓN

Dutante el procedimiento de verifiación de las metodologías microbiológicas participaron 2 analistas:

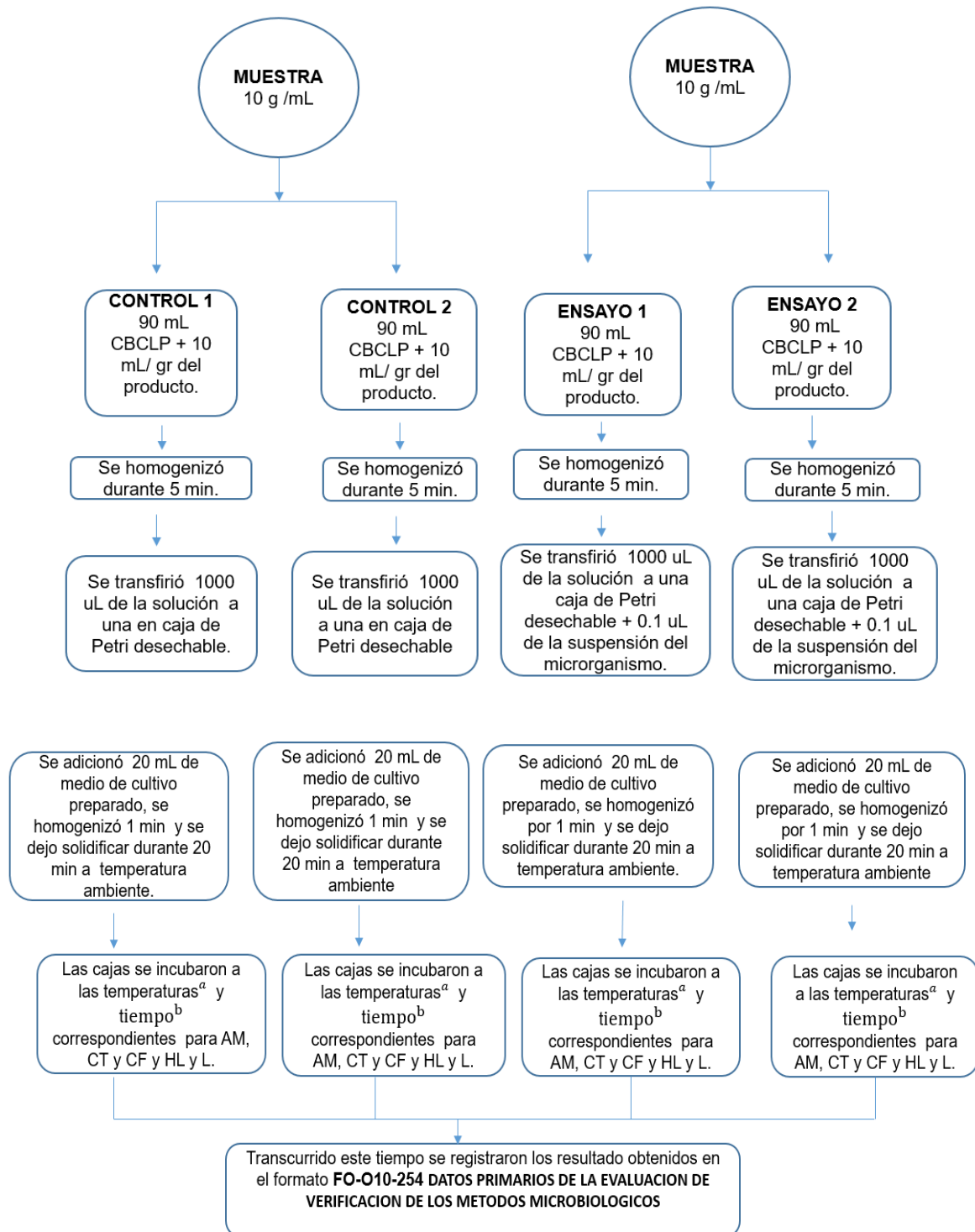
Analista 1: Oswaldo Parra Mayorga.

Analista 2: Enna Lorena Ardila Traslaviña.

La muestras utilizadas correspondes a productos terminados contaminados artificialmente con los microorganismos de referencia. Teniendo encuesta esto la metodología utilizada fue la siguiente:

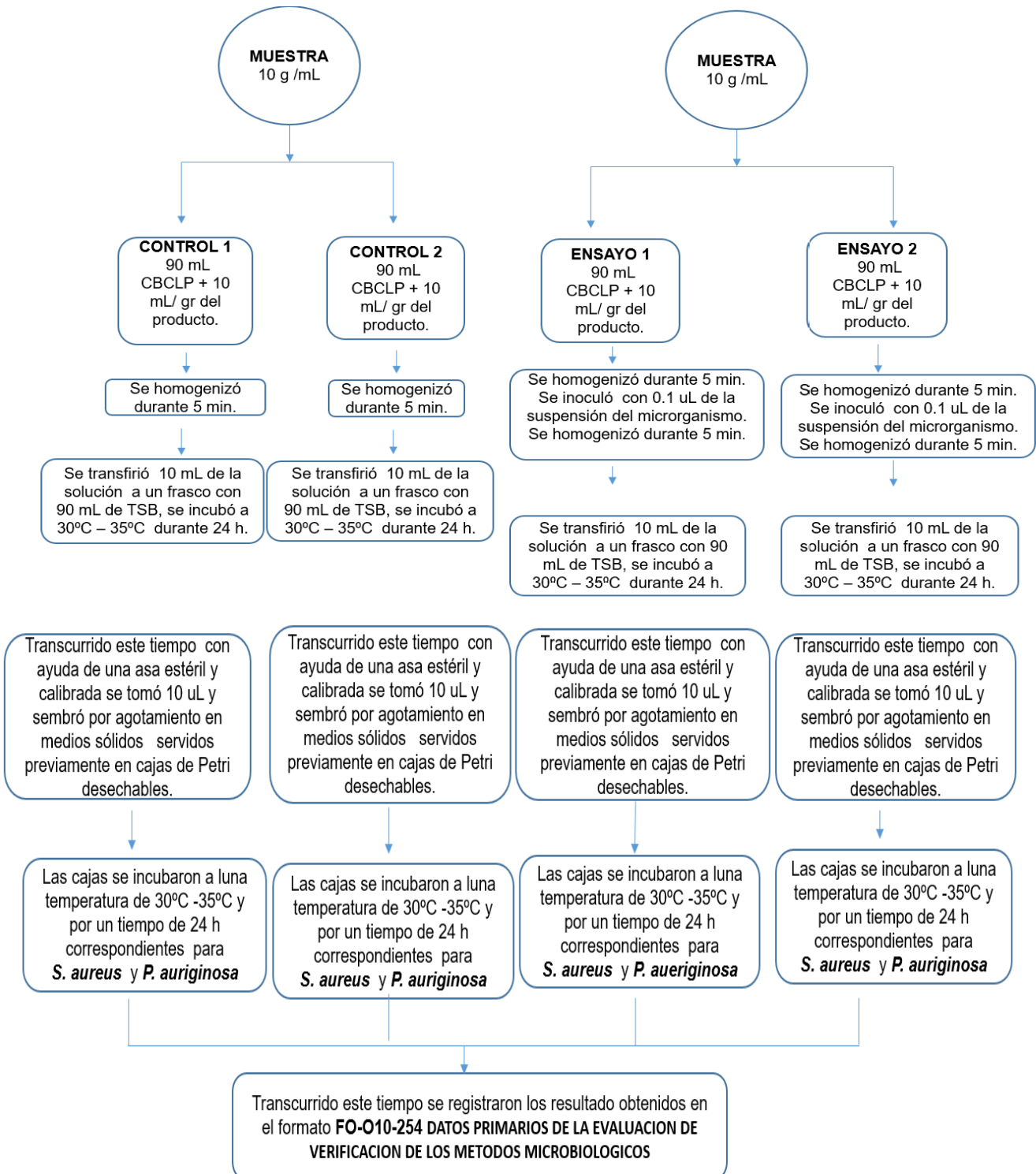
4.8.1. Recuento de Aerobios Mesófilos, Coliformes Totales y Fecales, Mohos y Levaduras.

Figura 2. Metodología empleada para recuento de Aerobios Mesofilos, Coliformes totales y fecales, Mohos y levaduras.



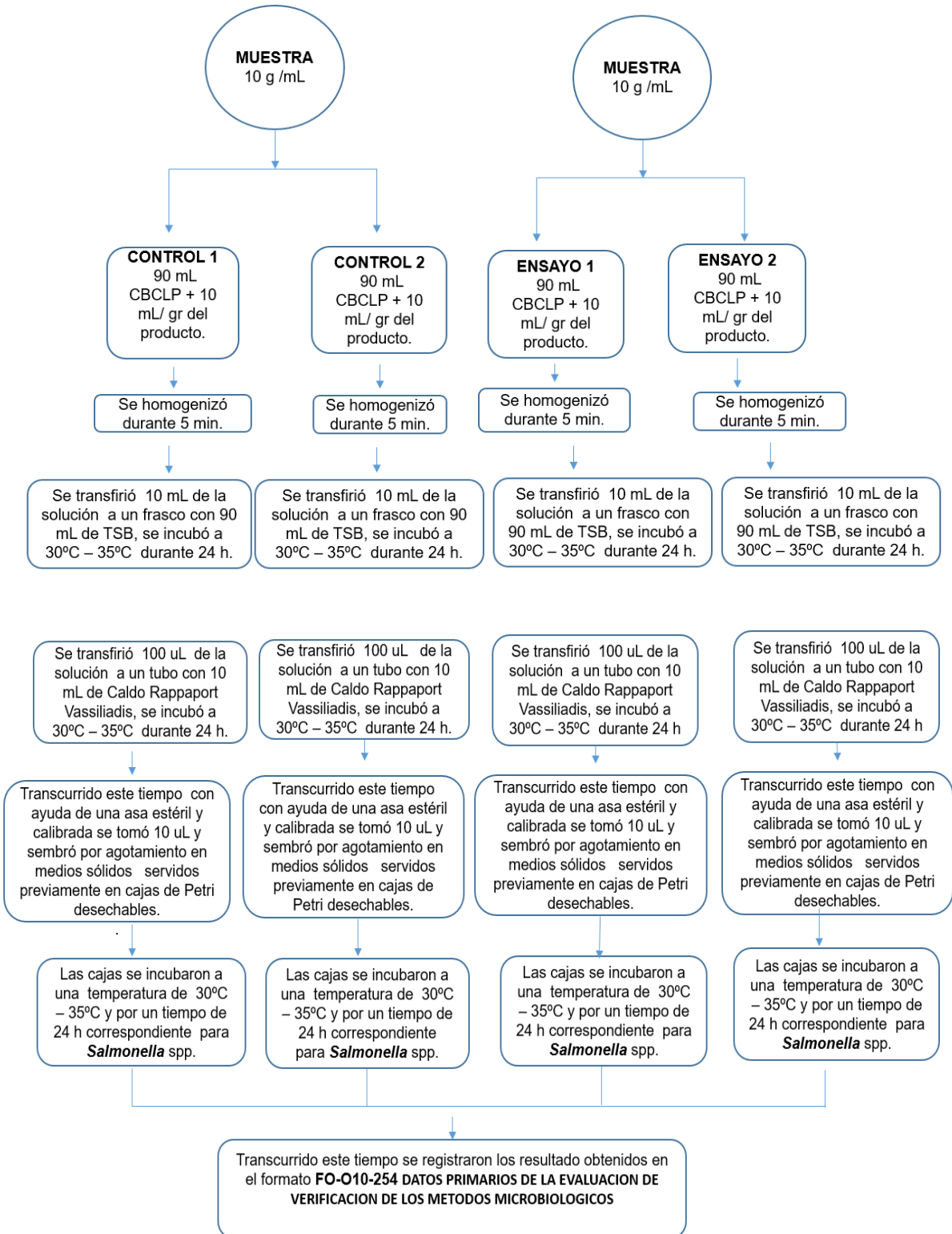
4.8.2. Verificación metodológica para la determinar la Ausencia/Presencia de *Pseudomonas aureginosa* y *Staphylococcus aureus*

Figura 3. Metodología empleada para determinar la Ausencia/Presencia de *Pseudomonas aureginosa* y *Staphylococcus aureus*.



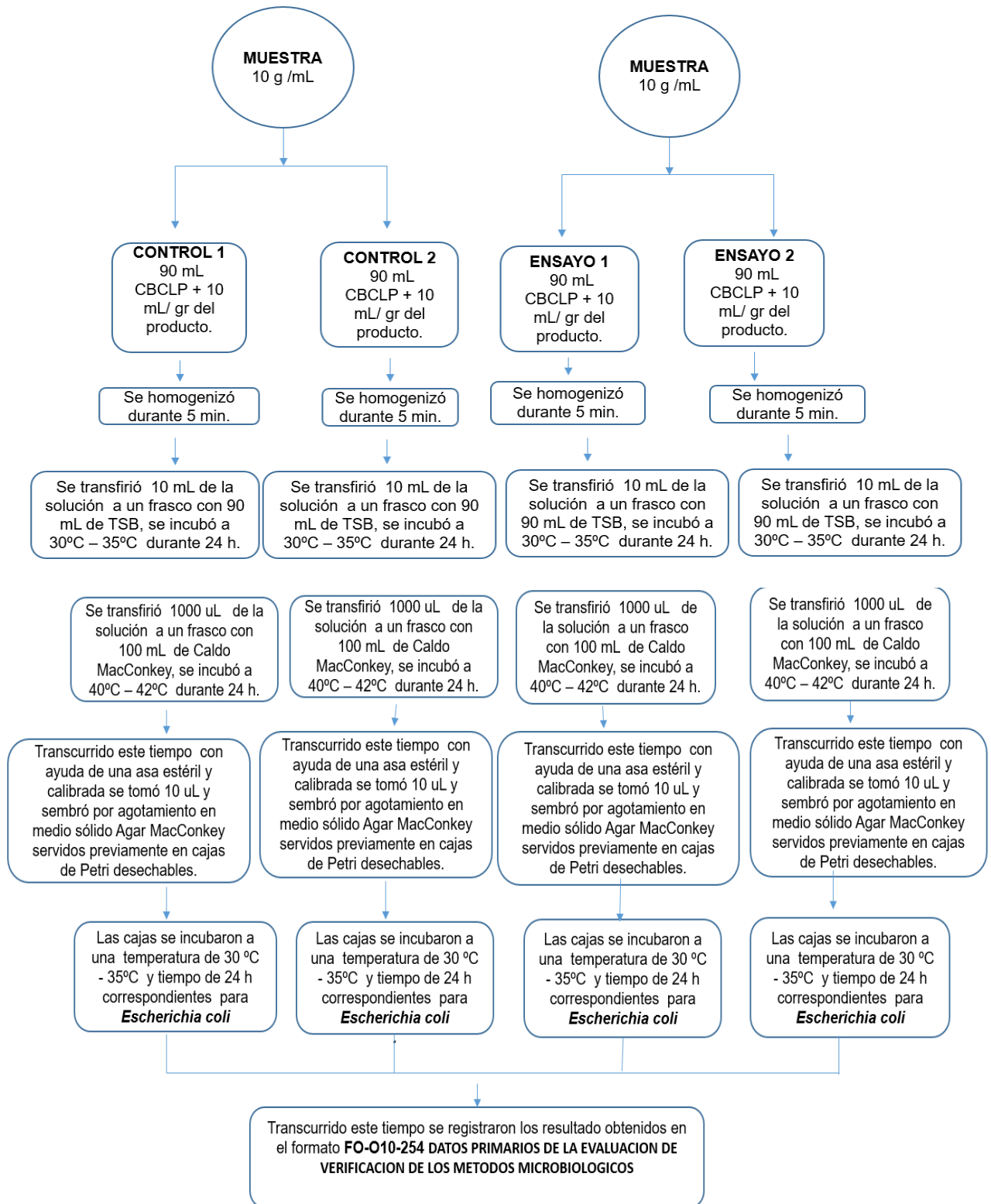
4.8.3. Verificación metodologica para la determinar la Ausencia/Presencia de *Salmonella* spp.

Figura 4. Metodología empleada para determinar la Ausencia/Presencia de *Salmonella* spp.



4.8.4. Verificación metodológica para la determinar la Ausencia/Presencia de *Escherichia coli*.

Figura 5. Metodología empleada para determinar la Ausencia/Presencia de *Escherichia coli*.



5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades/Semana		FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO	
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
1	INDUCCIÓN																		
2	INICIO DE LA PASANTIA																		
3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y ESTRUCTURACION DEL ANTEPROYECTO																		
4	PRESENTACIÓN DEL PRIMER AVANCE																		
5	PRERREQUISITOS PARA LA VERIFICACION DE LOS METODOS																		
6	DEFINICIÓN DE LA MATRIZ DE SELECCIÓN																		
7	PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS																		
8	PLAN DE VERIFICACIÓN																		
9	ANÁLISIS ESTADISTICO																		
10	ELABORACIÓN DEL INFORME																		
11	PRESENTACIÓN DEL INFORME																		
12	SUSTENTACIÓN																		

6. RESULTADOS

6.1. PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN

El protocolo de verificación se encuentra establecido en el documento IN-O10-109 PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN DE LOS METODOS MICROBIOLÓGICOS DEL LABORATORIO LABFARVE.

6.2. PRODUCTOS SELECCIONADOS

Los siguientes productos fueron los seleccionados utilizando la matriz de producto (Ver Anexo), se tuvieron en cuenta los parámetros anteriormente mencionados.

1. Frecuencia de fabricación de los lotes de cada producto en un año.
2. pH producto terminado.
3. Recuento microbiológico para aerobios mesófilos y hongos y levaduras (Expresado en Unidades logarítmicas).

Tabla 7. Productos Fitoterapeúticos seleccionados.

PRODUCTOS FITOTERAPEUTICOS	
 <p>120 ml LABFARVE EXTRACTO DE Hojas de tomate ANTIINFLAMATORIO</p>	 <p>360 ml LABFARVE SOLUCIÓN ORAL DE Caléndula ANTIINFLAMATORIO</p>
Extracto de hojas de tomate Enjuague bucal 120 mL N. de análisis: VM001-0418 Lote: 1011038	Solución oral de caléndula Antinflamatoria. 360 mL N. de análisis: VM002-0418 Lote: 997038



Loción de Gualanday antiséptico cutáneo

N. de análisis: VM003-0418
Lote:867107



Passiflora solución oral 60 mL.

N. de análisis: VM004-0418
Lote:989028



Extracto de valeriana solución oral 60 mL.

N. de análisis: VM004-0418
Lote:988028



Caléndula crema. Antiinflamatoria cicatrizante. 60 g

N. de análisis: VM007-0418
Lote:931127



Ajo desodorizado Hipotensor
Capsulas x 60 U

N. de análisis: VM008-0418
Lote:901117



Polvo de Gualanday antiséptico cutáneo

N. de análisis: VMO11-0418
Lote:868107



Levadura carminativa Antiflatulento Carminativo 120 g.

N. de análisis: VM012-0418
Lote747077

Tabla 8. Prueba de promoción de crecimiento para medios utilizados en la preparación y dilución de las muestras.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO DE REFERENCIA	INÓCULO UFC	TIEMPO Y TEMPERATURAS DE CRECIMIENTO	RESULTADO
Caldo Base de Caseína Lecitina Polisorbato Lote 106668	<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC® 9027.	27	≤ 3 días 30 °C -35 °C	Turbidez
	<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i> ATCC® 6633.	34		Turbidez
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538.	29		Turbidez
	<i>Candida albicans</i> ATCC® 6538.	38	5 días 20 °C -25 °C	Turbidez
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404	41		Turbidez
Caldo Trypticasa de soya Lote 106909	<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC® 9027.	27	≤ 3 días 30 °C -35 °C	Turbidez
	<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i> ATCC® 6633.	34		Turbidez
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538.	29		Turbidez
	<i>Candida albicans</i> ATCC® 6538.	38	5 días 20 °C -25 °C	Turbidez
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404	41		Turbidez

Tabla 9. Promoción de crecimiento de medios utilizados en la verificación de las metodologías.

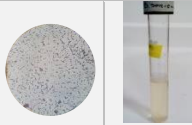
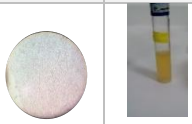
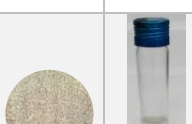



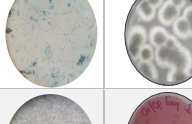
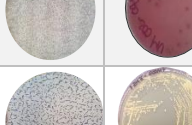
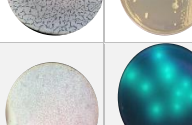
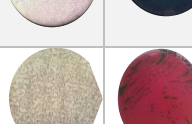
MEDIOS DE CULTIVO	MICROORGANISMO	CARACTERISTICAS OBSERVADAS	GRAM	IMAGEN	
CALDO BASE DE CASEINA LECITINA POLISORBATO	<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i> atcc® 6633.	Presencia de turbidez, crecimiento satisfactorio	Bacilos negativos	Gram	
CALDO TRIPTICASA DE SOYA	<i>Pseudomonas aureginosa</i> atcc® 9027.	Presencia de turbidez, crecimiento satisfactorio	Bacilos negativos	Gram	
CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS	<i>Salmonella enterica subsp. entérica serovar typhimurium</i> atcc® 14028.	Turbidez fuerte crecimiento de bueno a excelente	Bacilos negativos	Gram	
CALDO MACCONKEY	<i>Escherichia coli</i> atcc® 8739.	Crecimiento satisfactorio, color amarillo del caldo y producción de gas	Bacilos negativos	Gram	
AGAR TRIPTICASA DE SOYA	<i>Escherichia coli</i> atcc® 8739.	Crecimiento satisfactorio	Bacilos negativos	Gram	
AGAR SABOURAUD	<i>Aspergillus brasiliensis</i> atcc® 16404.	Crecimiento de bueno a excelente. Colonia: blanca-amarillento.	hongo hialino filamentoso	Gram	
AGAR V.R.B.A CON MUG	<i>Escherichia coli</i> atcc® 8739.	Colonias de color rojo profundo con precipitado rojo alrededor de las colonias.	Bacilos negativos	Gram	
AGAR SALADO MANITOL	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i> atcc® 6538.	Crecimiento satisfactorio. colonias amarillas rodeadas de un halo amarillo	Cocos Gram positivos	Gram	
AGAR CETRIMIDE	<i>Pseudomonas aureginosa</i> atcc® 9027.	Crecimiento satisfactorio con pigmento verde azulado alrededor de las colonias; fluorescencia bajo luz uv (254 nm)	Bacilos negativos	Gram	
AGAR XLD	<i>Salmonella enterica subsp. entérica serovar typhimurium</i> atcc® 14028.	Crecimiento de bueno a excelente; colonias rojas con centros de color negro	Bacilos negativos	Gram	

Tabla 10. Métodos Verificados en los diferentes Productos Seleccionados.

METODOLOGÍA	MICROORGANISMO	MEDIO UTILIZADO	TIEMPO INCUBACIÓN Y TEMPERATURA	PRODUCTO
RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> (ATCC® 6633™)	Tripticasa de soya	De 30 °C - 35°C durante un periodo de 3 a 5 días.	VM001- 0418 VM002- 0418 VM003- 0418 VM004- 0418 VM005- 0418 VM007- 0418 VM008- 0418 VM011- 0418
RECuento COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES	<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 8739™)	Agar V.R.B.A con MUG	De 30 °C - 35°C durante un periodo de 3 a 5 días.	VM001- 0418 VM002- 0418 VM003- 0418 VM004- 0418 VM005- 0418 VM007- 0418 VM008- 0418 VM011- 0418 VM012-0418
RECuento DE HONGOS	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC® 16404™)	Agar sabouraud dextrosa	De 20°C a 25°C durante 5 a 7 días.	VM001- 0418 VM002- 0418 VM003- 0418 VM004- 0418 VM005- 0418 VM007- 0418 VM008- 0418 VM011- 0418
RECuento DE LEVADURAS	<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™)	Agar sabouraud dextrosa	De 20°C a 25°C durante 5 a 7 días.	VM001- 0418 VM002- 0418 VM003- 0418 VM004- 0418 VM005- 0418 VM007- 0418 VM008- 0418 VM011- 0418
AUSENCIA/PRES ENCIA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 9027)	Agar tripticasa de soya	De 35°C por 24 horas.	VM001-0418 VM003-0418 VM007-0418 VM011-0418
		Agar Cetrimide	De 35°C por 24 horas.	
AUSENCIA/PRES ENCIA <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella enterica sub sp. enterica serovar Typhimurium</i> (ATCC® 14028™).	Agar tripticasa de soya	De 35°C por 24 horas.	VM002-0418 VM004-0418 VM005-0418 VM008-0418
		Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)	De 35°C por 24 horas.	
	<i>Escherichia coli</i>			VM001-0418

AUSENCIA/PRES ENICA DE <i>Escherichia coli</i>	(ATCC® 8739™).	Agar tripticasa de soya	De 35°C por 24 horas.	VM003-0418 VM007-0418 VM011-0418
		Agar MacConkey	De 35°C por 24 horas.	
AUSENCIA/PRES ENICA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (ATCC® 6538™).	Agar tripticasa de soya	De 35°C por 24 horas.	VM001-0418 VM003-0418 VM007-0418 VM011-0418
		Agar Salado Manitol	De 35°C por 24 horas.	

6.1. RESULTADOS DEL MÉTODO DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS

ANALISIS CUANTITATIVOS

RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 11. Resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Mesófilos *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1.585	0,035	2,212	98,72	-0,355
VM002-0418	1.476	0,054	3,659	76,92	-7,222
VM003-0418	1.556	0,088	5,677	92,31	-2,195
VM004-0418	1.572	0,049	3,091	96,15	-1,190
VM005-0418	1.544	0,018	1,137	89,74	-2,965
VM007-0418	1.536	0,053	3,437	87,18	-5,549
VM008-0418	1.579	0,024	1,526	97,44	-0,747
VM011-0418	1.568	0,128	8,140	96,15	-1,477
Log PROMOCION	1.591				

RESULTADOS ANALISTA 1

Tabla 12. Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Mesofilos *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.



RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 13. Resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Mésofilos de *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1,597	0,008	2,212	98,750	-0,343
VM002-0418	0,970	0,697	3,659	85,000	-39,468
VM003-0418	1,506	0,105	5,677	81,250	-6,023
VM004-0418	1,641	0,070	3,091	110,000	2,408
VM005-0418	1,681	0,013	1,137	112,500	4,937
VM007-0418	1,563	0,142	3,437	93,750	-2,464
VM008-0418	1,726	0,063	1,526	121,250	7,739
VM011-0418	1,735	0,039	8,140	131,250	8,329
Log PROMOCION	1,602				

RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 14. Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Aerobios Máesofilos *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* (ATCC® 6633™) en Agar Tripticasa de Soya.



6.2. RESULTADOS DEL METODO DE RECUENTO DE COLIFORMES FECALES Y COLIFORMES TOTALES

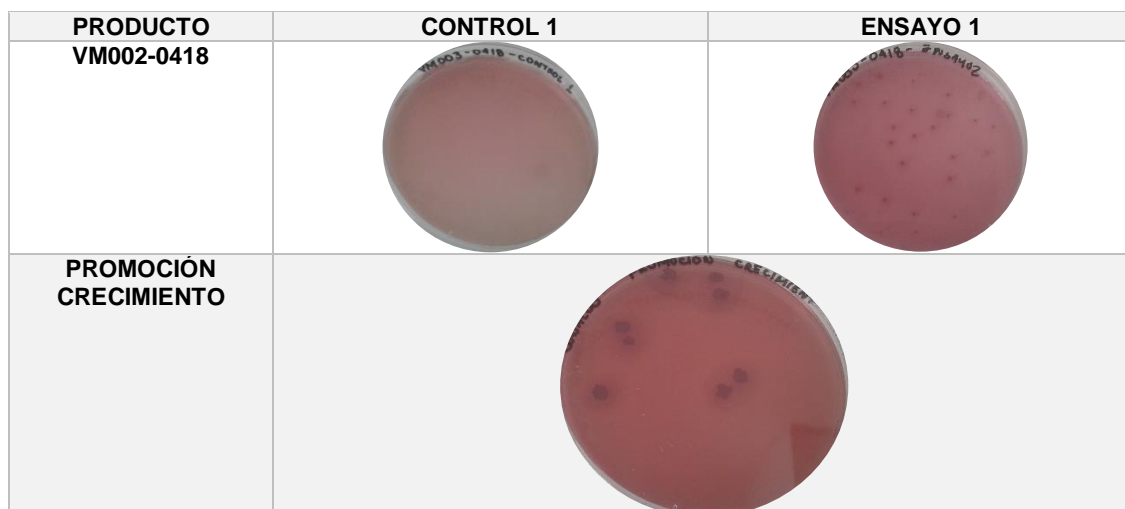
RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 15. Resultados obtenidos del Método de Recuento de Coliformes Fecales y Coliformes Totales *Escherichia coli* (ATCC®™) en Agar VRBA con MUG.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1,540	0,023	1,516	89,744	-3,235
VM002-0418	1,489	0,023	1,567	79,487	-6,395
VM003-0418	1,436	0,023	1,625	70,513	-9,759
VM004-0418	1,574	0,023	1,483	96,154	-1,073
VM005-0418	1,505	0,023	1,551	82,051	-5,413
VM007-0418	1,517	0,023	1,539	84,615	-4,673
VM008-0418	1,451	0,023	1,608	67,718	-8,803
VM011-0418	1,503	0,023	1,552	54,679	-5,520
VM012-0418	1,537	0,023	1,518	88,462	-3,372
Log PROMOCION	1,591				

RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 16. Imagenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Coliformes fecales y Coliformes totales *Escherichia coli* en Agar VRBA con MUG.



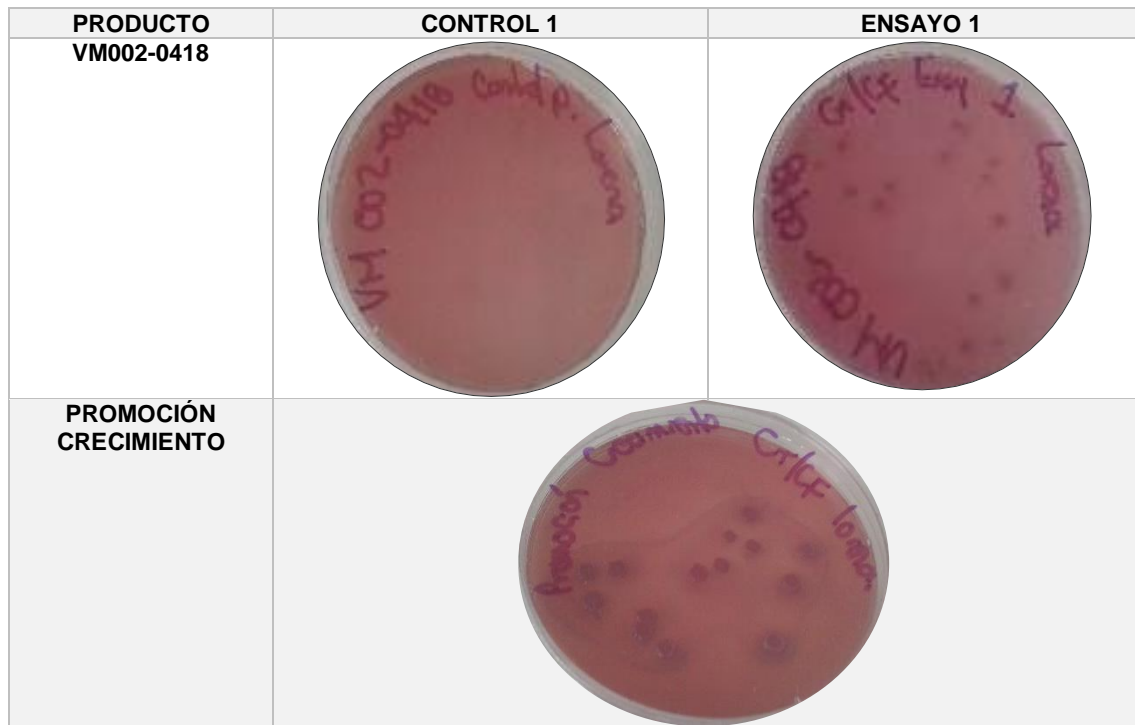
RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 17. Resultados obtenidos del método de Recuento de Coliformes fecales y Coliformes totales *Escherichia coli* (ATCC®™) en Agar VRBA con MUG.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1,430	0,012	0,810	192,857	-8,802
VM002-0418	1,423	0,064	4,480	189,286	-9,248
VM003-0418	1,460	0,079	5,383	207,143	-6,896
VM004-0418	1,436	0,120	8,360	196,429	-8,444
VM005-0418	1,447	0,040	2,743	203,571	-7,754
VM007-0418	1,490	0,010	0,676	221,429	-4,958
VM008-0418	1,484	0,017	1,119	217,857	-5,633
VM011-0418	1,568	0,069	4,370	264,286	-0,010
VM012-0418	1,554	0,069	4,411	97,297	-0,931
Log PROMOCION	1,568				

RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 18. Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Coliformes Fecales y Coliformes Totales *Escherichia coli* (ATCC®™) Agar VRBA con MUG.



6.3. RESULTADOS DEL MÉTODO DE RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS

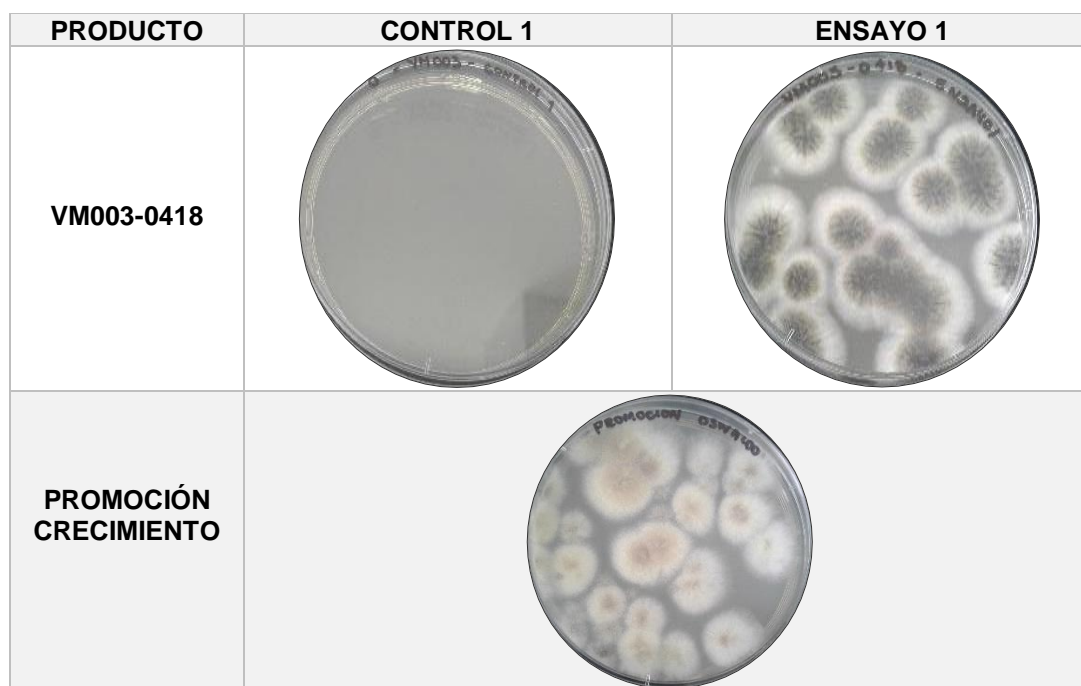
RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 19. Resultados obtenidos del método de Recuento de Mohos *Aspergillus brasiliensis* (ATCC® 16404™) en Agar Sabouraud.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1,511	0,023	1,545	98,485	-0,522
VM002-0418	1,484	0,054	3,639	92,424	-2,257
VM003-0418	1,518	0,088	5,821	100,000	-0,053
VM004-0418	1,544	0,009	0,560	106,061	1,671
VM005-0418	1,431	0,018	1,227	74,242	-5,759
VM007-0418	1,484	0,053	3,556	101,515	-2,257
VM008-0418	1,462	0,024	1,648	87,879	-3,712
VM011-0418	1,312	0,128	9,729	62,121	-13,624
Log PROMOCION	1,519				

RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 20. Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Hongos *Aspergillus brasiliensis* en Agar Sabouraud.



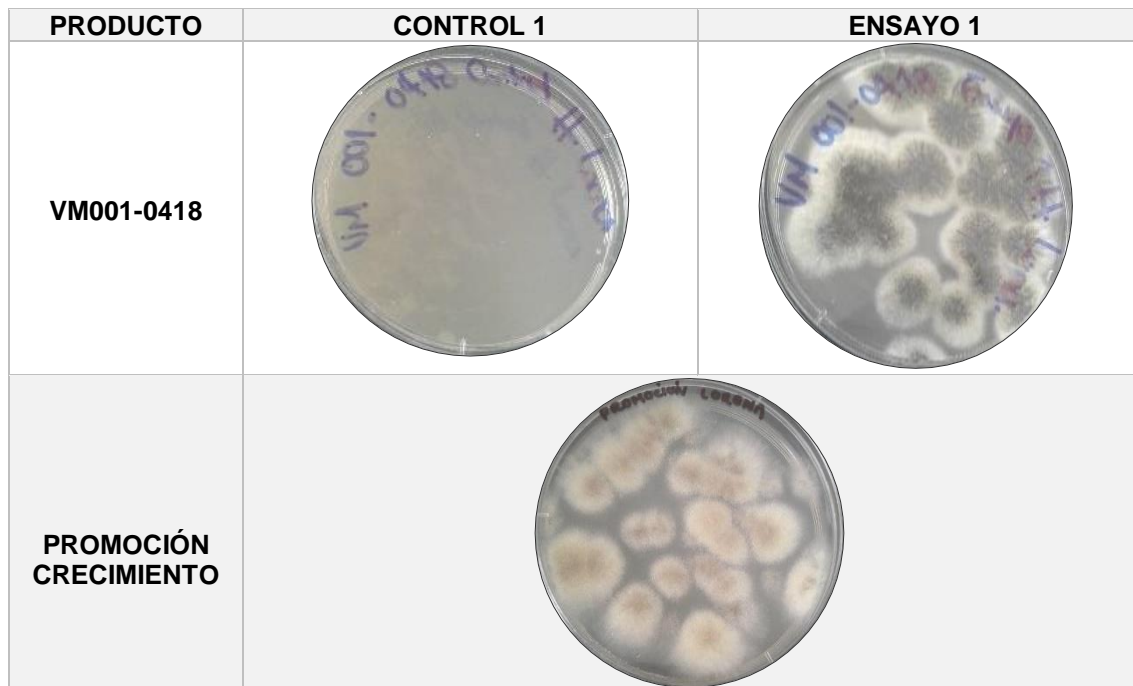
RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 21. Resultados obtenidos del método de Recuento de Hongos *Aspergillus brasiliensis* (ATCC® 16404™) en Agar Sabouraud.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1,484	0,010	0,678	78,205	-6,714
VM002-0418	1,531	0,036	2,363	87,179	-3,792
VM003-0418	1,502	0,077	5,139	82,051	-5,615
VM004-0418	1,470	0,000	0,000	71,795	-7,624
VM005-0418	1,574	0,025	1,562	96,154	-1,092
VM007-0418	1,518	0,037	2,456	84,615	-4,610
VM008-0418	1,503	0,064	4,284	78,205	-5,520
VM011-0418	1,511	0,036	2,393	79,487	-5,006
Log PROMOCION	1,591				

RESULTADOS ANALISTA 2

Tabla 22. Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de *Aspergillus brasiliensis* (ATCC® 16404™) en Agar Sabouraud.



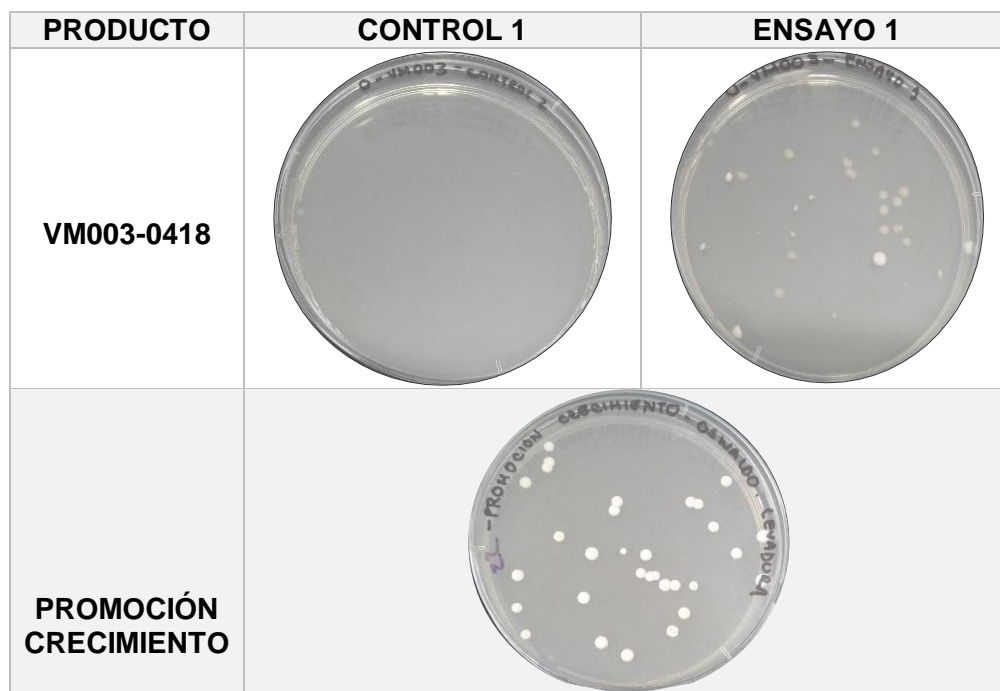
RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 23. Resultados obtenidos del método de Recuento de *Levaduras Candida albicans* (ATCC® 10231™) en Agar Sabouraud.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1,518	0,023	1,537	103,13	0,875
VM002-0418	1,521	0,054	3,551	104,69	1,059
VM003-0418	1,538	0,088	5,745	107,81	2,167
VM004-0418	1,541	0,071	4,574	109,38	2,396
VM005-0418	1,562	0,018	1,124	114,06	3,794
VM007-0418	1,573	0,053	3,355	115,63	4,512
VM008-0418	1,521	0,024	1,584	104,69	1,059
VM011-0418	1,511	0,128	8,447	101,56	0,362
Log PROMOCION	1,505				

RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 24. Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Levaduras *Candida albicans* (ATCC® 10231™) en Agar Sabouroud.



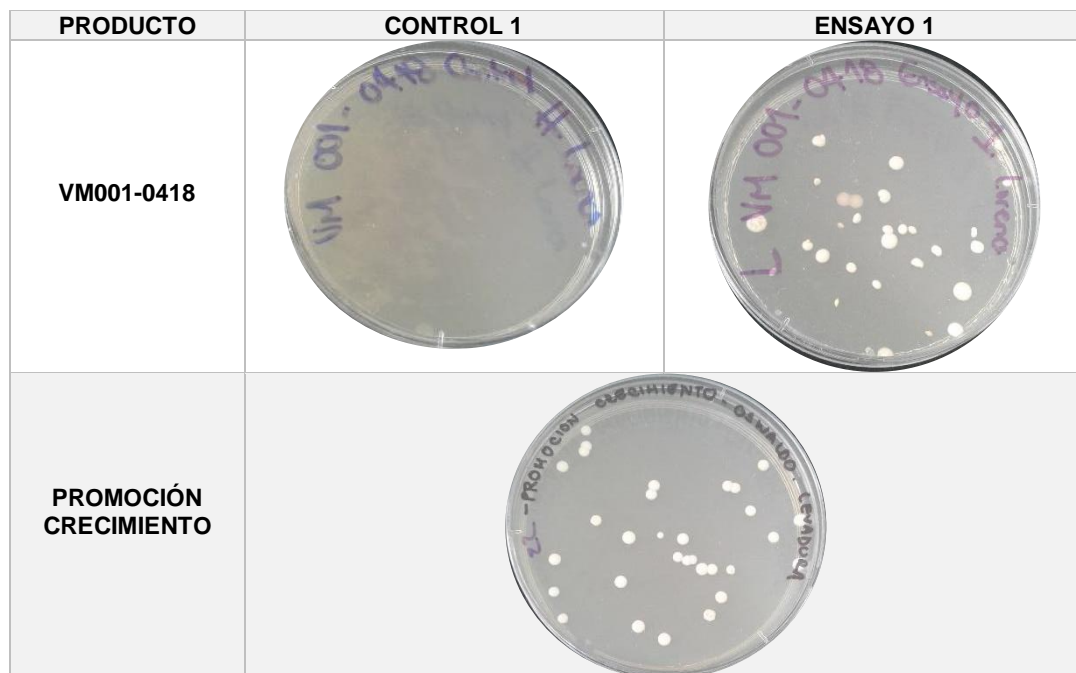
RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 25. Resultados obtenidos del método de recuento de Levaduras *Candida albicans* (ATCC® 10231™) en Agar Sabouraud.

RESULTADOS ANALISTA 2.

PRODUCTO	PROMEDIO Log ENSAYOS	DESVIACION ESTANDAR ENSAYO	COEFICIENTE DE VARIACION	PROMEDIO % DE RECUPERACION	ERROR RELATIVO
VM001-0418	1,528	0,073	4,749	121,43	5,618
VM002-0418	1,544	0,000	0,000	125,00	6,697
VM003-0418	1,612	0,045	2,794	146,43	11,364
VM004-0418	1,490	0,040	2,662	110,71	2,992
VM005-0418	1,637	0,052	3,163	119,64	11,601
VM007-0418	1,531	0,018	1,180	121,43	5,814
VM008-0418	1,369	0,066	4,792	83,93	-5,429
VM011-0418	1,528	0,073	4,749	121,43	5,618
Log PROMOCION	1,447				

Tabla 26. Imágenes de los resultados obtenidos del método de Recuento de Levaduras *Candida albicans* (ATCC® 10231™) en Agar Sabouraud.



6.4. Método de Ausencia/presencia de *Salmonella* spp en Agar XLD.

ANÁLISIS CUALITATIVOS

RESULTADOS ANALISTA 1 y 2.

Tabla 27. Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Salmonella* spp en Agar XLD.

AUSENCIA/ PRESENCIA <i>Salmonella</i> spp.								
PRODUCTO	ANALISTA 1: OSWALDO PARRA				ANALISTA 2: LORENA ARDILA			
	CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2	CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2
VM002-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM004-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM005-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM008-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
PROMOCION CRECIMIENTO	31				33			
TOTAL DE ENSAYOS	16				16			


A = Ausencia; P = Presencia

Tabla 28. Registra los resultados de los parámetros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de *Salmonella* spp.

AUSENCIA/ PRESENCIA <i>Salmonella</i> spp.									
ANALISTA 1: Oswaldo Parra					ANALISTA 2: Lorena Ardila				
Verdaderos Positivos (VP)	8	Sensibilidad	1	100 %	Verdaderos Positivos	8	Sensibilidad	1	100 %
Falsos Negativos (FN)	0	Especificidad	1	100 %	Falsos Negativos	0	Especificidad	1	100 %
Falsos Positivos (FP)	0	Tasa de Falsos Positivos	0		Falsos Positivos	0	Tasa de Falsos Positivos	0	
Verdaderos Negativos (VN)	8	Tasa de Falsos Negativos	0		Verdaderos Negativos	8	Tasa de Falsos Negativos	0	
Eficiencia			1	100 %	Eficiencia			1	100 %
KAPPA= 1					KAPPA= 1				

RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 29. Imágenes de los resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Salmonella* spp en Agar XLD.

PRODUCTO	CONTROL 1	ENSAYO 1
VM005-0418		
PROMOCIÓN CRECIMIENTO		

RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 30. Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Salmonella* spp en Agar XLD.

PRODUCTO	CONTROL 1	ENSAYO 1
VM008-0418		
PROMOCIÓN CRECIMIENTO		

6.5. Método de Ausencia/Presencia de *Escherichia coli* en Agar MacConkey

RESULTADOS ANALISTA 1 y 2.

Tabla 31. Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Escherichia coli* en Agar MacConkey.

AUSENCIA/PRESENCIA <i>Escherichia coli</i>								
PRODUCTO	CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ANALISTA 2:			
					CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2
VM001-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM003-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM007-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM011-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
PROMOCION CRECIMIENTO	12				17			
TOTAL DE ENSAYOS	16				16			

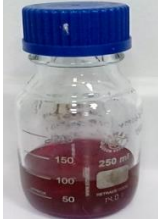
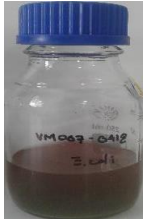
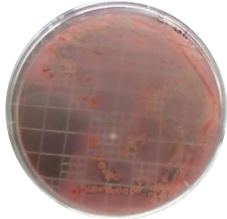


A = Ausencia; P = Presencia

Tabla 32. Resultados de los parámetros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de *Escherichia coli*.

AUSENCIA/PRESENCIA <i>Escherichia</i>									
ANALISTA 1: Oswaldo Parra					ANALISTA 2: Lorena Ardila				
Verdaderos Positivos	8	Sensibilidad	1	100 %	Verdaderos Positivos	8	Sensibilidad	1	100 %
Falsos Negativos	0	Especificidad	1	100 %	Falsos Negativos	0	Especificidad	1	100 %
Falsos Positivos	0	Tasa de Falsos Positivos	0		Falsos Positivos	0	Tasa de Falsos Positivos	0	
Verdaderos Negativos	8	Tasa de Falsos Negativos	0		Verdaderos Negativos	8	Tasa de Falsos Negativos	0	
Eficiencia			1	100%	Eficiencia			1	100 %
KAPPA= 1					KAPPA= 1				
-									

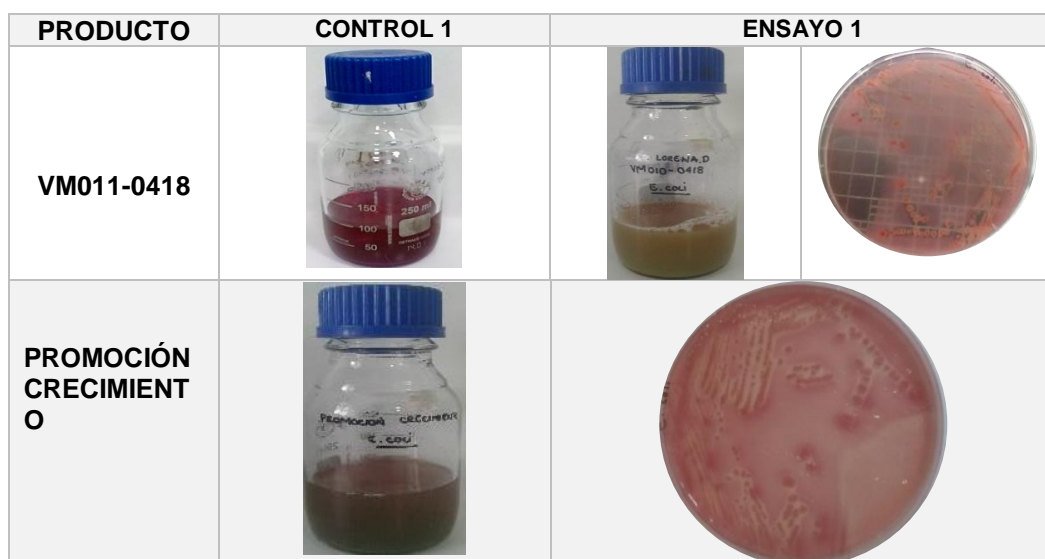
RESULTADOS ANALISTA 1.

Tabla 33. Se registran las imágenes de resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Escherichia coli* en Agar MacConkey.

PRODUCTO	CONTROL 1	ENSAYO 1	
VM007-0418			
PROMOCIÓN CRECIMIENTO			

RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 34. Imágenes de resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Escherichia coli* en Agar MacConkey.



6.6. Método de Ausencia/Presencia de *Pseudomonas aureginosa* en Agar Cetrimide.

RESULTADOS ANALISTA 1 y 2.

Tabla 35. Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Pseudomonas aureginosa* en Agar Cetrimide.

AUSENCIA/ PRESENCIA <i>Pseudomonas aureginosa</i>								
ANALISTA 1: OSWALDO PARRA					ANALISTA 2			
PRODUCTO	CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2	CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2
VM001-0418	A	A	A	P	A	A	P	P
VM003-0418	A	A	P	A	A	A	A	P
VM007-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM011-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
PROMOCION CRECIMIENTO	12				15			
TOTAL DE ENSAYOS	16				16			

A = Ausencia; P = Presencia

Tabla 36. Registra los resultados de los parámetros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de *Pseudomonas aureginosa*.

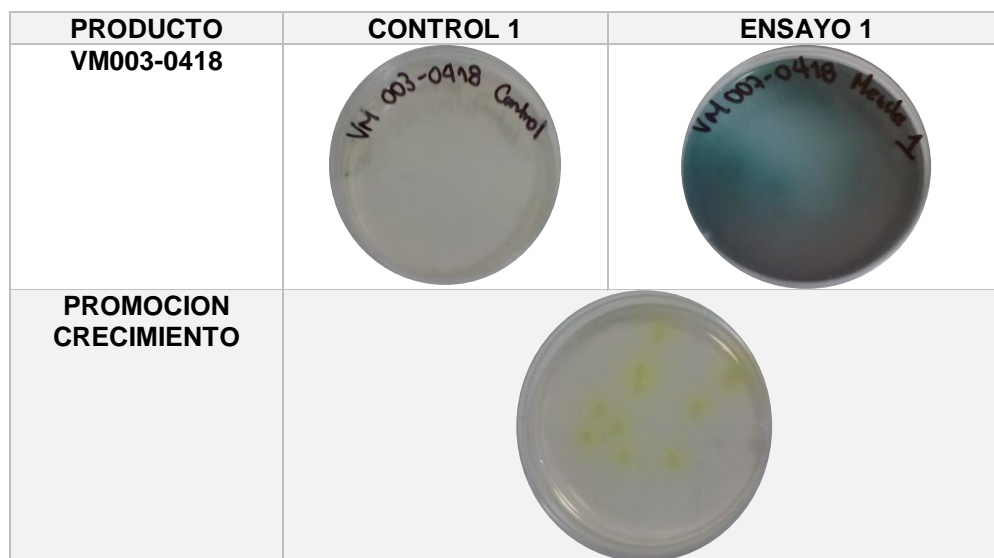
AUSENCIA/ PRESENCIA <i>Pseudomonas aureginosa</i>									
ANALISTA 1: Oswaldo Parra					ANALISTA 2: Lorena Ardila				
Verdaderos Positivos	6	Sensibilidad	0,750	75 %	Verdaderos Positivos	7	Sensibilidad	0,875	87.5 %
Falsos Negativos	2	Especificidad	1	100 %	Falsos Negativos	1	Especificidad	1	100 %
Falsos Positivos	0	Tasa de Falsos Positivos	0		Falsos Positivos	0	Tasa de Falsos Positivos	0	
Verdaderos Negativos	8	Tasa de Falsos Negativos	0,210		Verdaderos Negativos	8	Tasa de Falsos Negativos	0,111	
Eficiencia			0,875	87.5 %	Eficiencia			0,937	93.7 %
KAPPA= 0.75					KAPPA= 0.875				

Tabla 37. Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Pseudomonas aureginosa* en Agar Cetrimide.

PRODUCTO	CONTROL 1	ENSAYO 1
VM007-0418		
PROMOCION CRECIMIENTO		

RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 38. Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Pseudomonas aureginosa* en Agar Cetrimide.



6.7. Método de Ausencia / Presencia de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol.

RESULTADOS ANALISTA 1 y 2.

Tabla 39. Resultados obtenidos para el método de Ausencia / Presencia de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol.

AUSENCIA/PRESENCIA <i>Staphylococcus aureus</i>								
PRODUCTO	ANALISTA 1:				ANALISTA 2:			
	CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2	CONTROL 1	CONTROL 2	ENSAYO 1	ENSAYO 2
VM001-0418	A	A	P	P	A	A	A	P
VM003-0418	A	A	P	P	A	A	P	A
VM007-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
VM011-0418	A	A	P	P	A	A	P	P
PROMOCION CRECIMIENTO	11				10			
TOTAL DE ENSAYOS	16				16			

A = Ausencia ; P = Presencia

Tabla 40. Registra los resultados de los parametros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol.

ANALISTA 1: Oswaldo Parra					ANALISTA 2: Lorena Ardila				
Verdaderos Positivos	8	Sensibilidad	1	100%	Verdaderos Positivos	6	Sensibilidad	0,75	75%
Falsos Negativos	0	Especificidad	1	100%	Falsos Negativos	2	Especificidad	1	100%
Falsos Positivos	0	Tasa de Falsos Positivos	0		Falsos Positivos	0	Tasa de Falsos Positivos	0	
Verdaderos Negativos	8	Tasa de Falsos Negativos	0		Verdaderos Negativos	8	Tasa de Falsos Negativos	0,2	
Eficiencia			1	100%	Eficiencia			0,875	87.50%
KAPPA=1					KAPPA=0.82				

RESULTADOS ANALISTA 1

Tabla 41. Imágenes obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol.



RESULTADOS ANALISTA 2.

Tabla 42. Resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC®™) en Agar Salado Manitol.

PRODUCTO	CONTROL 1	ENSAYO 1
VM003-0418		
PROMOCION DE CRECIMIENTO		

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

METODOS CUALITATIVOS (Ausencia/Presencia)

La especificidad de un método microbiológico cualitativo es la capacidad del método de diferenciar específicamente el compuesto de interés (microorganismo), en presencia de los demás componentes. En un procedimiento analítico, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de microorganismos en concentraciones adecuadas, y la demostración de que estos microorganismos se recuperan adecuadamente. En cuanto a la especificidad esta es la capacidad del método de diferenciar específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes u otros microorganismos presentes en el producto.

La validez de un estudio puede verse severamente afectada si se utilizan mediciones poco fiables. Una importante fuente de error de medición es producto de la variabilidad inter observador, cuya magnitud es posible de estimar a través de los llamados estudios de concordancia, los cuales tienen como objetivo estimar hasta qué punto dos observadores (analistas) coinciden en su medición. Estadísticamente, la manera de abordar este problema depende de la naturaleza de los datos. El test más frecuentemente empleado es el test de kappa, cuyo coeficiente homónimo refleja la fuerza de la concordancia entre dos observadores. En términos simples, el coeficiente kappa (κ) corresponde a la proporción de concordancias observadas sobre el total de observaciones, habiendo excluido las concordancias atribuibles al azar. El coeficiente kappa (κ) toma valores entre -1 y +1; mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter-observador. (Cerdeja J & Villarroe L, 2008).

Landis y Koch en 1997 propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa:

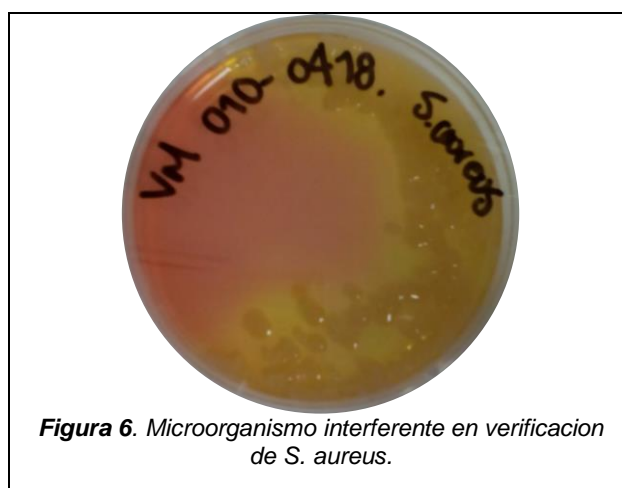
Tabla 43. Escala de valoración del k

kappa	Grado de acuerdo
< 0	Sin acuerdo
0,1 - 0,2	Insignificante
0,21 - 0,4	Bajo
0,41 - 0,6	Moderado
0,61 - 0,8	Bueno
0,81 - 1	Muy Bueno

Como pudo verse en las tablas 1 y 31, los resultados obtenidos para el método de Ausencia/presencia de *Salmonella enterica* subsp. Entérica serovar *typhimurium* (ATCC® 14028) en Agar XLD y los resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Escherichia coli* (ATCC® 8739) en Agar MacConkey, respectivamente, demuestran una sensibilidad, especificidad y eficiencia del 100% para el ensayo realizado para los analistas 1 y 2, de igual forma los índices kappa mostrados en la Tabla 42, tienen un grado de concordancia muy bueno. Lo anterior permite demostrar que el método cumple satisfactoriamente con los parámetros estadísticos requeridos para la verificación.

En la Tabla 2 se registraron los resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Pseudomonas aureginosa* en Agar Cetrimide; los cuales arrojaron valores para la sensibilidad del 81 %, especificidad del 100 % y 90.62 % de eficacia. La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, con respecto a estos parámetros, aconseja establecer un valor para eficiencia mayor del 90% y para falsos negativos o positivos menor del 10%. Para sensibilidad y especificidad establecer criterios previos. Se aconseja que sean superiores al 90%, indicando que la metodología evaluada esta debajo de los porcentajes establecidos para el parámetro de eficiencia. En el caso del índice Kappa, se obtuvo un grado de concordancia muy bueno, según lo establecido en los rangos de la Tabla 43.

En la Tabla 39 se registra los resultados de los parametros estadísticos para el método cualitativo de ausencia y presencia de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol para el parámetro de sensibilidad fue del 87.5%, especificidad del 100%, una eficacia del 93.75 % y un índice kappa muy bueno. Para el caso de esta metodología se pudo observar un crecimiento no característico de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol para algunos de los productos evaluados, este crecimiento caracterisitico incluye en el desarrollo normal de *Staphylococcus aureus*, afectando su crecimiento, lo que se ve reflejado en el porcentaje de sensibilidad de la metodología verificada (ver Figura 2).



Se comprobó que el método para la detección de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp es específico, sensible, eficaz y no afecta ninguno de los productos

evaluados en la detección de estos microorganismos, observando crecimiento característico en los medios selectivos utilizados.

De acuerdo con los resultados anteriores, se procedió a comparar si existen o no diferencias entre los métodos cualitativos debido a los analistas mediante el Test de MacNemar con un nivel de significancia del 0,05.

Planteamiento de las hipótesis

H₀= El método no presenta diferencias entre los 2 analistas.

H_A=El método si presenta diferencias entre los 2 analistas.

H₀= Hipotesis Nula

H_A= Hipotesis Alternativa

Tabla 44. Comparacion de los niveles de significancia de los analistas por el Test de MacNemar para metodologías cualitativas, a un valor $p < 0,05$.

METODO (AUSENCIA/ PRESENCIA)	Niveles de significancia
<i>E. coli</i>	0.09
<i>Salmonella spp</i>	0.09
<i>S. aureus</i>	0.06
<i>P. aureginosa</i>	0.07

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 44, se acepta la hipótesis nula, es decir que el método no presenta diferencias significativas entre los 2 analistas, puesto que los valores de P obtenidos en todos los casos fueron mayores al 0,05.

METODO DE RECuento DE AEROBIOS MESOFILOS, MOHOS Y LEVADURAS Y COLIFORMES TOTALES Y FECALES

ANALISIS CUANTITATIVOS

En el caso de microbiología y teniendo en cuenta la dificultad de la obtención del valor de referencia, se emplea la exactitud relativa. El término "exactitud" cuando se aplica en microbiología en ensayos de recuento, es equivalente a la recuperación media. (Cerdeja J & Villarroe L, 2008). Según los porcentajes de

recuperación obtenidos en cada uno de los ensayos de las metodologías que se verificaron, la mayoría de porcentajes de recuperación fueron mayores al 70%, para cada uno de los productos sometidos a la verificación, es evidente que, los microorganismos con los que se contaminó los productos tienen la capacidad de crecer en presencia del producto preservado con parabenos, gracias a la acción inactivante del polisorbato presente en el caldo nutritivo usado en la verificación (caldo lecitina polisorbato 20).

En todos los casos se obtuvo porcentajes de recuperación superiores al 90%, con excepción del producto VM011-0418, el cual presentó un porcentaje de recuperación menor al 70% requeridos por la USP 40, en las metodologías de mohos y coliformes totales para el analista 1, al contrario del analista 2, donde todos los porcentajes de recuperación fueron mayores a los establecidos por la USP 40. Lo anterior se debe a la acción de los parabenos ya que estos presentan un amplio espectro frente a mohos y levaduras, aunque también poseen actividad antimicrobiana. Las demás metodologías y microorganismos evaluados presentaron porcentajes mayores al 70%, pudiendo comprobar que estas metodologías poseen la capacidad de detectar un amplio rango de microorganismos presentes en los productos.

Cuando nos referimos a precisión, hacemos referencia a un grado de concordancia entre los resultados obtenidos al implementar una metodología repetidas veces bajo unas condiciones controladas. La precisión depende solo de la distribución de errores aleatorios y por el contrario no tiene ningún vínculo con el valor específico. Este estará dado como el coeficiente de variación.

Conforme lo establecido en la USP 40, se puede denominar como una metodología precisa teniendo en cuenta que todos los valores obtenidos del coeficiente de variación son menores al 15%. Al realizar el análisis del coeficiente de variación entre analistas, se pudo observar un grado de homogeneidad y grado de concordancia entre los datos obtenidos, por lo que se puede establecer que, este cumple ya que el valor de referencia según la USP 40, no puede superar el 35%. Se puede determinar que los dos ensayos realizados por los analistas, se controló adecuadamente las variables que pudieran afectar los resultados de estos ensayos.

La precisión del sistema es la que pretende evaluar la capacidad de los microorganismos de crecer en el caldo nutritivo utilizado para realizar la verificación (Caldo lecitina polisorbato 20), siendo evaluado por el crecimiento de los microorganismos estándares en ausencia del producto preservado con parabenos, con el fin de evidenciar cambios en el sistema establecido (ver Tabla 8).

Conforme a los resultados anteriores, se procedió a comparar si existen o no diferencias entre los métodos debido a los analistas usando una prueba no paramétrica similar a la t Student, denominada prueba de la U de Mann – Whitney con un nivel de significancia del 0,05.

Planteamiento de las hipótesis

H_0 = El método no presenta diferencias entre los 2 analistas.

H_A =El método presenta diferencias entre los 2 analistas.

H_0 = Hipotesis Nula

H_A = Hipotesis Alternativa

Tabla 45. Comparacion de las medias de los analistas por la prueba de la U de Mann-Whitney (Test no paramétrico).

MÉTODO	Valor p calculado	Diferencias significativas	Resultado
Recuento Aerobios mesofilos	0,0745	Ns	NO
Recuento de Coliformes totales/ Coliformes Fecales	0,8046	Ns	NO
Recuento de Mohos	0,4613	Ns	NO
Recuento de Levaduras	0,8747	Ns	NO

(Ns: No existen diferencias significativas; $P < 0,05$)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la tabla 45, se rechaza la hipótesis alternativa que establece que el método presenta diferencias significativas entre los analistas; puesto que los p valores obtenidos en todos los métodos son mayores al 0.05, y por lo tanto se acepta la hipótesis nula, la cual establece que el método NO presenta diferencias entre los 2 analistas.

Los métodos verificados y que no presentan diferencias entre los analistas evaluados son: Recuento Aerobios mesofilos, Recuento de Coliformes totales/ Coliformes Fecales, Recuento de Mohos y Recuento de Levaduras, los cuales son Métodos Cuantitativos Normalizados por la USP Vigente. Es importante mencionar que, durante la verificación de los procedimientos se mantuvo un estricto control sobre los diferentes parámetros del laboratorio, como lo son los tiempos de incubación, las temperaturas, la humedad, etc., de esta manera se controlan las posibles variables que pueden afectar la veracidad de los resultados durante los diferentes análisis que se realizan. El poder establecer que no existen diferencias entre analistas en cada uno de los métodos es un factor de confianza que brinda el laboratorio al proceso de Control de Calidad microbiológico, puesto que esto permite asegurar los resultados, aún cuando el análisis sea realizado por personal diferente pero que se encuentre debidamente capacitado.

8. CONCLUSIONES

- Se comprobó mediante el plan de verificación, que las metodologías farmacopeicas aplicadas en el control de calidad de productos no estériles en el laboratorio **LABFARVE** cumplen con los criterios establecidos en la USP 40.
- Se pudo establecer los prerrequisitos requeridos para la comprobación de los métodos microbiológicos normalizados en el laboratorio **LABFARVE**, el cual corresponden con la documentación y los resultados obtenidos en la comprobación de las metodologías.
- Se pudo evaluar la precisión de los métodos microbiológicos mediante la aceptabilidad de las desviaciones estándares de cada solución analizada; obteniendo un coeficiente de variación con valores menores al 15%. En cuanto a la exactitud de los métodos de recuento de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras y Coliformes Totales y Fecales, la recuperación de gran parte de muestras adicionales fue satisfactoria, según estos resultados los métodos microbiológicos cumplen con lo establecido en la USP 40.

9. RECOMENDACIONES

- Se hace necesario la identificación del microorganismo interferente, presente en la prueba de ausencia y presencia para *S aureus* en los productos **VM007-0418**.
- Se recomienda volver a verificar las metodologías usadas para Coliformes totales y fecales, al igual que para mohos del producto VM011-0418.
- Se debera tener un contrato de mantenimiento permanente para la calibración de equipos, con el fin de asegurar que se están utilizando equipos completamente calibrados.

10. GLOSARIO

Analito: componente medido por el método de análisis. En el caso de métodos microbiológicos esto es el microorganismo sus componentes o productos asociados (enzimas o toxinas)

Especificidad: (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado.

Nota: También puede definirse como la capacidad de un método de no detectar el microorganismo diana, si este no está presente.

Exactitud de medida: proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando.

Nota: Es la combinación de la precisión y la veracidad. La exactitud en los ensayos microbiológicos, pueden determinarse mediante los resultados obtenidos en los interlaboratorios (que dan una idea de precisión) y mediante el análisis de un material de referencia certificado (que da una indicación de la veracidad)

Exactitud relativa: Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido.

Nota: En lo posible deben utilizarse muestras idénticas. Sin embargo, cuando se utilizan diferentes pre-enriquecimientos, se hace necesario la duplicación de las muestras.

Factor de cobertura (k): factor numérico utilizado como multiplicador de la incertidumbre de medida para obtener una incertidumbre expandida de medición.

Nota: Típicamente su valor se encuentra entre 2 y 3

Incertidumbre de medida: Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando.

Nota: El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo de ella), o la mitad de un intervalo de un nivel de confianza determinado.

Incertidumbre combinada, $u_c(y)$: incertidumbre estándar de un resultado, y , de una medición cuando ese resultado es obtenido a partir de valores de otras cantidades, que es igual a la raíz cuadrada positiva de la suma de los términos, siendo estos términos, las varianzas o covarianzas de esas cantidades divididas por los resultados de esas mediciones.

Incertidumbre estándar, $u(x_i)$: incertidumbre del resultado x_i de una medición expresada como una desviación estándar.

Incertidumbre expandida (U): cantidad que define a un intervalo en torno al resultado de una medición que puede esperarse que incluya una fracción grande de la distribución de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando.

Inclusividad/ Exclusividad: inclusividad es la capacidad de un método alternativo de detectar el microorganismo diana a partir de un amplio rango de cepas. Exclusividad es la falta de interferencia, en un método alternativo, a partir de un rango amplio de cepas no -diana.

Nota: La exclusividad expresa la capacidad del método de no detectar a los microorganismos no - diana, es decir aquellos que pueden presentar reacciones cruzadas con el microorganismo diana. La inclusividad es el rango de cepas que refleja la diversidad Genética y / o serológica del microorganismo diana que el método puede detectar. La inclusividad y la exclusividad se determinan sobre un amplio rango de cultivos puros de cepas diana y no -diana, mientras que la sensibilidad/especificidad se determinan en matrices contaminadas. La inclusividad/exclusividad da una medida de la selectividad del método. Este requisito no es aplicable al recuento total de microorganismos viables, recuento de hongos y levaduras o métodos de enumeración que no están dirigidos contra microorganismos específicos.

Límite de detección: aplicado a ensayos microbiológicos cualitativos, es el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión.

Límite de cuantificación: aplicado a ensayos microbiológicos cuantitativos, es el número mínimo de microorganismos dentro de una variabilidad definida que puede determinarse en las condiciones experimentales del método evaluado.

Nota: También se lo denomina límite de determinación. Representa el nivel más bajo validado con una precisión satisfactoria.

Mensurando: magnitud que se desea medir.

Nota: En microbiología el mensurando es definido en términos del método empleado. Puede expresarse, por ejemplo, como ufc por la unidad de cantidad de muestra (ufc/ml ó ufc/g). Ejemplo: en la determinación cuantitativa de *Listeria* en leche, el mensurando puede ser el resultado obtenido a partir del recuento de colonias, luego que se han seguido todos los pasos especificados en el método de ensayo.

Método cualitativo: método de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado de forma directa o indirecta en una cierta cantidad de muestra.

Método cuantitativo: método de análisis cuya respuesta es la cantidad del analito medido de forma directa (enumeración en masa o volumen), o indirecta (color, absorbancia, impedancia, etc.) en una cierta cantidad de muestra.

Método de referencia: método internacionalmente reconocido y ampliamente aceptado.

Nota:(por ejemplo, NMKL, ISO, CEN, métodos de AOAC Internacional, métodos que se indican en la Unión Europea, en las legislaciones nacionales y ciertas normas nacionales de calidad equivalente).

Método alternativo: método de análisis que demuestra o estima, para una dada categoría de productos, el mismo analito que se mide utilizando el correspondiente método de referencia.

Precisión de medida: proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Nota: Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas. Las “condiciones especificadas” pueden ser condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad

Precisión intermedia: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones. Las variaciones pueden comprender nuevas calibraciones, patrones, operadores y sistemas de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que involucren variaciones y las que no.

Rango de validación: rango de número medio de partículas por porción analítica para el cual las expectativas de las especificaciones de validación (en particular linealidad) han sido aceptablemente demostradas.

Nota: por lo general se expresa como el rango de recuento de colonias “confiable”.

Repetibilidad: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

Reproducibilidad: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes procedimientos de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no.

Robustez: capacidad de un método para mantenerse sin cambios ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Nota; las variaciones a las que hace referencia la definición son por ejemplo, cambios en las condiciones ambientales, en las condiciones de incubación (tiempo/temperatura), calidad y vida útil de medios de cultivo y reactivos, pH, etc. La información de la prueba de robustez puede utilizarse para especificar las condiciones en que debe ser aplicado el método

Sensibilidad (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): Fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son correctamente asignados con el método utilizado. También puede definirse como la capacidad de un método de detectar el microorganismo diana, cuando este está presente.

Tasa de Falsos Positivos (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): es la probabilidad o frecuencia con que la muestra sea asignada como positiva cuando en realidad es negativa. Falsos Positivos son aquellos que han sido asignados como tales conociendo que en realidad son negativos.

La incidencia de falsos positivos es igual a: $1 - \text{especificidad}$.

Tasa de Falsos Negativos (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): es la probabilidad o frecuencia con que una muestra conocida como positiva, sea asignada como negativa por el método. La incidencia de falsos negativos es igual a $1 - \text{sensibilidad}$.

Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

Veracidad: proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia.

Nota: El verdadero valor de una cantidad es un concepto teórico y, en general, no puede ser conocido exactamente. En la práctica el valor de referencia aceptado puede sustituir al valor verdadero. La veracidad se expresa habitualmente en términos de sesgo o bias. Es aceptado, en los ensayos microbiológicos cuantitativos, que no se tenga en cuenta al sesgo, en la estimación de la incertidumbre de medición debido a la naturaleza empírica los métodos microbiológicos. Es el procedimiento analítico el que determina directamente el resultado de la medición, por ejemplo, el número de unidades formadoras de colonias por unidad de muestra. Por lo tanto, no es posible en la práctica determinar el valor verdadero que se requiere para determinar el sesgo. Incluso cuando se utilicen materiales de referencia certificados, o los valores derivados de los Ensayos de Aptitud, sólo puede evaluarse una parte del sesgo.

En cualquier caso, aun cuando no se evalúe el componente de la incertidumbre debida al sesgo, el laboratorio puede demostrar que se encuentra bajo control, por ejemplo, mediante su participación en ensayos de aptitud o mediante el ensayo de materiales de referencia certificados.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia española de medicamentos y Productos Sanitarios. (2010). Guía de normas de correcta fabricación de medicamentos de uso humano y veterinario. *Se definen como “la parte de la garantía de calidad que asegura que los medicamentos son elaborados y controlados de acuerdo con las normas de calidad apropiadas para el uso al que están destinados”*. Madrid: AEMPS. Consultado: 14 de Marzo de 2018.
- Arias J., Ortiz D., Gonzales A. (2013). Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*; 47(2):178-184.
- Cabrera C. (2015). Validación del método microbiológico cilindro en placa para determinación de la potencia de neomicina en producto farmacéutico triconjugado (Neomicina, Clotrimazol y Betametasona). Universidad Católica de Manizales.
- Camaró M., Martínez R., Olmos P., Catalá V., Ocete M., Gimeno C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.33 (7): pág. 31– pág. 36.
- Cerda J, Villarroé L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr.*, 79 (1): 54-58.
- Cortes A. (2002). Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Entidad Nacional de Acreditación ENAC. (2002). Guía para la Acreditación de Laboratorios que realizan Análisis Microbiológicos. Consultado: 14 de Marzo de 2018.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2017). La farmacopea y el formulario nacional de Estados Unidos (USP-NF). *Para estándares de medicamentos, proporciona acceso a monografías y pruebas necesarias para producir productos farmacéuticos, excipientes, suplementos dietéticos, productos biológicos y otros productos terapéuticos de calidad*. USP. Consultado: 14 de Marzo de 2018.
- FDA. (2004). “Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processes”, *Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practices*, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center

for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Chapter 9 “Validation on Aseptic Processing and Sterilization”, United States. Consultado: 14 de Marzo de 2018.

- Garcia E. (2001). Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Galeno N. (2007). Validación de la retención microbiana en los filtros de acetato y nitrato de celulosa empleados en la técnica de filtración por membrana para la prueba de esterilidad. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Guía Técnica Colombiana GTC 84. (2003). Guía para la Orientación acerca de la Validación de Métodos de Análisis Microbiológicos. Bogotá, Colombia. Consultado: 14 de Marzo de 2018.
- Hoyos M. (2010). Guía validación de métodos. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- L&S Consultores. (2003). Validación de métodos de Ensayo. Norma Técnica.
- Medina, J. Quintana, S. (2002). Validación microbiológica de las áreas de producción de la vacuna contra la fiebre amarilla y laboratorios de aseguramiento de la calidad en el Instituto Nacional de Salud. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Mora C. (2009). Calidad farmacéutica: Nuevos enfoques de las buenas prácticas de manufactura. Revista Colombia: ciencia, química y farmacéutica, 38(1), 42-58. Bogotá D.C.: Departamento de farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Mora J., (2015). Implementación y desarrollo de la técnica de potencia microbiológica de antibióticos y su impacto económico en la empresa Calox de Costa Rica, S.A.
- Ministerio de Protección Social. (2008). Resolución Número 3028 de 2008. Agosto 13, por la cual se definen las áreas técnicas de producción de los establecimientos farmacéuticos y se establecen otras disposiciones. Bogotá: Invima. Consultado: 14 de Marzo de 2018.

- Organización Mundial de la Salud. (2010). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Guía de autoevaluación de BPL. *Se aplican a cualquier laboratorio de control de calidad de productos farmacéuticos*. Red PARF. Consultado: 14 de Marzo de 2018.
- Organización Mundial de la Salud. (1992). Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas Informe 32. *Este informe presenta las recomendaciones de un grupo internacional de expertos convocado por la Organización Mundial de la Salud para que examine diversos asuntos relativos a la garantía de la calidad de los productos farmacéuticos y las especificaciones aplicables a sustancias y formas farmacéuticas*. Ginebra: OMS, 1992. Consultado: 14 de Marzo de 2018.
- Otálora Andrés, Ortiz, J. Peñaranda, S. Palma, R. Puentes, W. Murillo, C. Peralta, A. Tovar. G. (2005). Séptimo curso-taller Validación de métodos analíticos. Laboratorio salud Ambiental. Programa de vigilancia de la calidad del agua potable, metales y no metales de interés en Salud Pública. Bogotá, D.C.
- Padilla J. (2007). Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá- Colombia.
- Soler P. (2006). Validación secundaria del método de número más probable en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestras de alimentos basada en la norma ISO NTC 17025. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Sueros G. (2013). Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Velandia J. (2008). Validación del método analítico para la cuantificación de Bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

12. ANEXOS

Anexo 1. MATRIZ DE SELECCIÓN PARA VERIFICACION DE METODOLOGIAS MICROBIOLÓGICAS

MATRIZ DE SELECCIÓN PARA VERIFICACIÓN DE METODOLOGIAS MICROBIOLÓGICAS

Para la selección de los productos que se desearán en la validación de limpieza de los equipos productivos, se tendrán en cuenta los parámetros de:

1. Frecuencia de fabricación de los bates de cada producto.
2. pH producto terminado
3. Recuento microbiológico.

Para dichos parámetros se realiza la calificación en una escala de 1 a 3 en frecuencia, pH y recuentos microbiológicos con los siguientes criterios:

FRECUCENCIA	PONDERACIÓN		RANGOS		
	1	2	3	0 - 5 LOTES CADA AÑO	6 - 11 LOTES CADA AÑO

Ph	PONDERACIÓN		RANGOS		
	1	2	3	9,1 a 11 BASICO	6,6 a 9 NEUTRO

RECIENTOS MICROBIOLÓGICOS LOG10	PONDERACIÓN		RANGOS		
	1	2	3	3,30 A 3,47	3,0 A 3,29

PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS ENJAGUE BUCAL														
LOTE	Nº MESOFILES	MESOFILES	COLOFORMES TOTALES	COLOFORMES FÉCALIS	Log hongos y levaduras	HONGOS LEYADURAS	SALMONELA	ACUMULADO LOTES	pH	FRECUENCIA DE FABRICACION	pH	MESOFILOS RECIENTO	HONGOS RECIENTO	PONDERADO
625027	1,30	30	<10	<30	1	30	N/A		5,8					
666057	1,00	30	<10	<30	1	30	N/A		6					
729077	1,60	40	<10	<30	1	30	N/A	5	5,6	1	3	3	3	10
851107	1,00	30	<10	<30	1	30	N/A		6,3					
929127	1,60	40	<10	<30	1	30	N/A		5,38					
1														



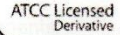

PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS JARABE														
LOTE	Nº MESOFILES	MESOFILES	COLOFORMES TOTALES	COLOFORMES FÉCALIS	Log hongos y levaduras	HONGOS LEYADURAS	SALMONELA	ACUMULADO LOTES	pH	FRECUENCIA DE FABRICACION	pH	MESOFILOS RECIENTO	RECIENTO HONGOS	PONDERADO
655047	2,89	780	<10	<30	1,70	30	Ausencia		6,3	1	2	3	3	9
834097	1,00	30	<10	<30	1,00	30	Ausencia	2	6,09					
1,95														

SOLUCIÓN ORAL DE CALENDULA JARABE x 360 mL														
LOTE	Nº MESOFILES	MESOFILES	COLOFORMES TOTALES	COLOFORMES FÉCALIS	Log hongos y levaduras	HONGOS LEYADURAS	SALMONELA	ACUMULADO LOTES	pH	FRECUENCIA DE FABRICACION	pH	MESOFILOS RECIENTO	RECIENTO HONGOS	PONDERADO
534027	1,00	30	<10	<30	1	30	Ausencia		7,83					
575027	1,60	40	<10	<30	1	30	Ausencia		7					
609027	2,15	140	<10	<30	1,70	60	Ausencia		7,24					
646047	3,30	1690	<10	<30	1,00	30	Ausencia		7,21					
675057	3,06	1160	<10	<30	2,20	200	Ausencia		7,04					
676057	3,02	1090	<10	<30	3,08	130	Ausencia		7,29					
705057	3,01	1030	<10	<30	2,15	140	Ausencia		7,62					
706067	2,85	710	<10	<30	2,04	130	Ausencia	15	7,44	3	2	3	3	11
725077	2,18	150	<10	<30	2,20	160	Ausencia		7,12					
762087	1,95	90	<10	<30	1,85	70	Ausencia		7,2					
800087	2,86	720	<10	<30	2,11	130	Ausencia		7,25					
827097	2,36	230	<10	<30	1,00	30	Ausencia		7,66					
828097	2,63	430	<10	<30	2,06	120	Ausencia		7,23					
890117	1,60	40	<10	<30	1,00	30	Ausencia		7,12					
922127	1,30	30	<10	<30	1,00	30	Ausencia		7,2					
2,36														

Anexo 2. CERTIFICADOS DE ANALISIS DE CEPAS



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

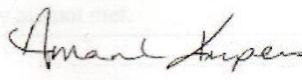
<p>Specifications Microorganism Name: Aspergillus brasiliensis Catalog Number: 0392 Lot Number: 392-769** Reference Number: ATCC® 16404™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 69 CFU per 0.1 ml</p>	<p>Expiration Date: 2019/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Megan C Wipper Release Date: 2018/1/27</p>
<p style="text-align: center;">Performance</p> <p>Macroscopic Features: Rapidly growing colonies which are initially white or pale yellow, quickly become black with conidia (spore) production. Reverse is pale yellow.</p> <p>Microscopic Features: Chains of small conidia which arise from short sterigmata arranged radially over the surface of the vesicle</p> <p>Medium: PDA</p> <p>Method: Lactophenol Blue (1)</p>	
<p>ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.</p> <p style="text-align: right;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </p>	
<p><small>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="367 1164 574 1310">  ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 </div> <div data-bbox="367 1321 518 1377">  </div> <div data-bbox="614 1310 1476 1355"> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="367 1400 574 1545">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div> <div data-bbox="614 1388 989 1422"> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="614 1545 1476 1590"> <p><small>(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.</small></p> </div> </div>	



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-612** Reference Number: ATCC® 6538™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value (MAV): 68 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Cassandra L. Hall Release Date: 2017/10/20
---	---

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

ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	---

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

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

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


Individual products are traceable to a recognized culture collection.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Candida albicans Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-801** Reference Number: ATCC® 10231™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value (MAV): 42 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Tanner E Rothstein Release Date: 2017/7/10
---	---

Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies.	Medium: Nutrient
Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Method: Gram Stain (1)

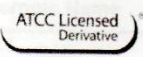
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamyospore production: positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	---

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

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




TESTING CERT #2655.01



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-642** Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value (MAV): 34 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Tanner E Rothstein Release Date: 2017/4/7
---	--

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, gray, mucoid, convex. Microscopic Features: Gram negative straight rod.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)

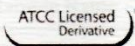
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	--

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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


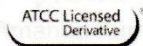

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



TESTING CERT #2655.01


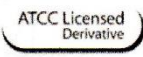



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium Catalog Number: 0363 Lot Number: 363-273** Reference Number: ATCC® 14028™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value (MAV): 54 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Megan C Wipper Release Date: 2017/3/14
Performance	
Macroscopic Features: Medium, gray/white, circular, slightly irregular edges, convex colonies Microscopic Features: Gram negative straight rods	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Hektoen Enteric agar: good growth, blue-green colonies with black centers (1) Salmonella O antiserum Factor O:4 (Included in group B): positive (1) Salmonella O antiserum Factor O:5 (Included in group B): positive (1) Salmonella O antiserum Factor O:12 (Included in group B): positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> </div> <p>TESTING CERT #2655.01</p>	




Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Bacillus subtilis subsp. spizizenii Catalog Number: 0486 Lot Number: 486-610** Reference Number: ATCC® 6633™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value (MAV): 38 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Tanner E Rothstein Release Date: 2017/8/1
Performance	
Macroscopic Features: Large, irregular, flat, undulate edge, gray and wrinkled with ground glass appearance; beta hemolysis and slight yellow coloring may appear in wrinkles by 48 hours.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Straight, gram positive rod, with an ellipsoidal, central or terminal endospore.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Purple Broth w/Rhamnose: negative (1) Purple broth w/Lactose: negative MYP Agar: Growth of yellow, dry colonies without precipitate  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> </div> <p>TESTING CERT #2655.01</p>	

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-900** Reference Number: ATCC® 9027™** Purity: Pure Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 63 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2019/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/10/26
--	--

Performance	
Macroscopic Features: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen. A second colony type may also be present as small, round, shiny colonies.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod.	Method: Gram Stain (1)

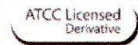
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive Pseudomonas P Agar: positive (blue-green color diffusing into the agar) Growth at 42 C: positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	--

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

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



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

Anexo 3. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Sabouraud Dextrosa (Oxoid)	
Dextrosa	40,0 g
Mezcla digerido peptídico de tejido animal y digerido pancreático de caseína 1:1	10,0 g
Agar	15,0 g
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de $5,6 \pm 0,2$ a 25°C . Esterilizar en una autoclave utilizando un ciclo válido.

Agar MacConkey (Oxoid)	
Digerido pancreático de gelatina	17,0 g
Peptonas (de carne y caseína)	3,0 g
Lactosa Monohidrato	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sales biliares	1,5 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	30,0 mg
Cristal violeta	1 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de $7,1 \pm 0,2$ a 25°C . Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando constantemente, y luego esterilizar en una autoclave usando un ciclo valido.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Oxoid)	
Xilosa	3,5 g
L -Lisina	5,0 g
Lactosa Monohidrato	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Rojo fenol	80 mg
Agar	13,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Citrato férrico Amónico	0,8 g
Agua purificada	1000 mL

Ajuste el pH para que después del calentamiento sea de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C . Calentar a ebullición, enfriar a 50°C y verter en placas de Petri. No calentar en autoclave

Agar Cetrimida (Merck)	
Digerido pancreático de Gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0 g
Cetrimida	0,3 g
Agar	13,6 g
Agua purificada	1000 mL
Glicerol	10 mL

Calentar a ebullición durante 1 minuto con agitación. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C . Esterilizar en autoclave utilizando un ciclo valido.

Agar Manitol Salado (Oxoid)	
Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0g
Extracto de carne	1,0 g
D-Manitol	10,0 g
Cloruro de sodio	75,0 g
Agar	15,0 g
Rojo fenol	0,025 g
Agua purificada	1000 mL

Calentar a ebullición durante 1 minuto con agitación. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C . Esterilizar en autoclave en un ciclo valido.

Agar Violeta Bilis Rojo Glucosa (Oxoid)	
Extracto de levadura	3,0 g
Digerido pancreático de gelatina	7,0 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Glucosa monohidratada	10,0 g
Agar	15,0 g
Rojo Neutro	30 mg
Cristal Violeta	2 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH para que después del calentamiento sea de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C . Calentar hasta el punto de ebullición; no calentar en autoclave

CALDOS

Caldo Mossel para Enriquecimiento de Enterobacterias (Oxoid)	
Digerido pancreático de gelatina	10,0 g
Glucosa monohidratada	5,0 g
Bilis de buey deshidratada	20,0 g
Fosfato monobásico de Potasio	2,0 g
Fosfato Dibasico de sodio dihidrato	8,0 g
Verde brillante	15 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH para que después del calentamiento sea de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C . Calentar a 100°C durante 30 minutos y enfriar inmediatamente.

Caldo MacConkey (Oxoid)	
Digerido pancreatina de gelatina	20.0 g
Lactosa Monohidrato	10.0 g
Bilis de buey deshidratada	5,0 g
Purpura de bromocresol	10 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de $7,3 \pm 0, 2$ a 25°C . Esterilizar en autoclave utilizando un ciclo validado.

Caldo Rappaport-Vassiliadis para enriquecimiento de Salmonella (Oxoid)	
Peptona de soja	4,5 g
Cloruro de magnesio hexahidrato	29,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato dibasico de potasio	0,4g
Fosfato monobásico de potasio	0,6 g
Verde de malaquita	0.036 g
Agua purificada	1000 mL

Disolver, calentando ligeramente. Esterilizar en autoclave utilizando un ciclo validado a una temperatura que no exceda de 115°C . El pH debe ser de $5,2 \pm 0,2$ a 25°C luego del calentamiento y esterilización en autoclave.