

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE FARMACIA**



INFORME FINAL DE PRÁCTICA DIRIGIDA
Mejora en el Proceso de la Prueba de Recuento Microbiano
para Productos Farmacéuticos No Estériles en el
Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos de la
Caja Costarricense de Seguro Social

Centro de Práctica:

Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos
de la Caja Costarricense de Seguro Social.

Estudiante:

Iria Yang Lee.
B47757.

Comité Asesor:

Dr. Mario Oreamuno Ávila.
Dra. Arlene Loría Gutiérrez.
Dr. Jorge Pacheco Molina.

ENERO A JUNIO 2019

Firmas de los Integrantes del Tribunal Examinador y Estudiante



Dr. Jorge Pacheco Molina

Coordinador de Práctica Dirigida

Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica



Dra. Arlene Loría Gutiérrez

Tutor Académico

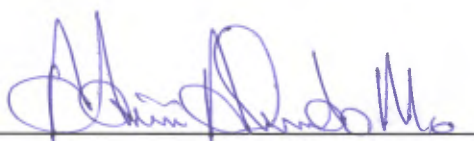
Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica



Dr. Mario André Oreamuno Ávila

Tutor Técnico en el Centro de Práctica

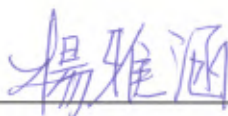
Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos de la CCSS



Dr. Adrián Alvarado

Lector del Informe de Práctica Dirigida

Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica



Iria Yang Lee

Estudiante

Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	3
RESUMEN	6
MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA.....	7
MEMORIA DE ACTIVIDADES DE LA PRÁCTICA DIRIGIDA	10
TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	21
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	22
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS	26
<i>Objetivo General</i>	26
<i>Objetivos Específicos</i>	26
MARCO TEÓRICO.....	27
<i>Medios de Cultivo</i>	27
1. Clasificación de Medios de Cultivo basados en la consistencia	27
2. Clasificación de Medios de Cultivo basados en la composición.....	29
3. Clasificación de Medios de Cultivo basados en la función, propósito o aplicación.....	30
4. Medios de Cultivo en el Recuento Microbiano	30
5. Factores que afectan a los medios de cultivo	33
6. Esterilización de los Medios de Cultivo	36
<i>Cepas Microbiológicas</i>	37
1. <i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i> ATCC 6538 (28).....	39
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (29).....	39
3. <i>Bacillus subtilis</i> spp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633 (30).....	39
4. <i>Candida albicans</i> Serotipo A ATCC 10231 (31)	40
5. <i>Aspergillus brasiliensis</i> o <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 (32).....	40
<i>Validación del Procedimiento de Preparación de los Medios de Cultivo</i>	41
<i>Estudios de Estabilidad de los Medios de Cultivo</i>	42
<i>Prueba de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles</i>	43
1. Tipos de Análisis bioanalíticos	44
2. Métodos de Conteo Microbiano	47

3. Métodos de Recuento en Placa	48
<i>Aptitud del Método de Recuento Microbiano</i>	49
RECURSOS	51
1. Equipos	51
2. Materiales.....	52
3. Reactivos.....	52
4. Cepas microbiológicas	53
METODOLOGÍA.....	54
<i>Identificación de las mejores prácticas y recomendaciones internacionales para la fabricación de medios de cultivo</i>	54
<i>Validación del Procedimiento de Preparación de Medios de Cultivo</i>	54
<i>Estudio de Estabilidad de los Medios de Cultivo</i>	54
<i>Actualización de la Prueba de Recuento Microbiano</i>	56
<i>Verificación de la Aptitud del Método de Recuento Microbiano</i>	56
RESULTADOS	57
<i>Identificación de las mejores prácticas y recomendaciones internacionales para la fabricación de medios de cultivo</i>	57
<i>Validación del Procedimiento de Preparación de Medios de Cultivo</i>	61
1. Ejecución de los lotes de medios de cultivo	61
2. Análisis de los medios de cultivo fabricados	62
3. Desviaciones de resultados fuera de especificación	65
<i>Estudio de Estabilidad de los Medios de Cultivo</i>	66
1. Inspección visual de los atributos de calidad	66
2. Acidez del medio de cultivo	67
3. Prueba de Promoción de los Medios de Cultivo.....	69
<i>Actualización de la Prueba de Recuento Microbiano</i>	84
<i>Verificación de la Aptitud del Método de Recuento Microbiano</i>	86
DISCUSIÓN	89
<i>Identificación de las mejores prácticas y recomendaciones internacionales para la fabricación de medios de cultivo</i>	89
<i>Validación del Procedimiento de Preparación de Medios de Cultivo</i>	91

<i>Estudio de Estabilidad de los Medios de Cultivo</i>	98
<i>Actualización de la Prueba de Recuento Microbiano</i>	100
<i>Verificación de la Aptitud del Método de Recuento Microbiano</i>	102
CONCLUSIONES.....	102
RECOMENDACIONES	104
REFERENCIAS.....	105
ANEXO 1	112
ANEXO 2.....	120
ANEXO 3.....	133
ANEXO 4.....	151

RESUMEN

Yang, I. Mejora en el proceso de la prueba de Recuento Microbiano para Productos Farmacéuticos No Estériles en el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos de la Caja Costarricense de Seguro Social. Informe Final de Práctica Dirigida. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica; 2019.

Comité Asesor:

Asesor Técnico del Centro de Práctica Dirigida: Dr. Mario Oreamuno Ávila.

Asesor Académico de la Facultad de Farmacia: Dra. Arlene Loría Gutiérrez.

Coordinador de Práctica Dirigida: Dr. Jorge Pacheco Molina.

Se buscó en farmacopeas, normativas internacionales y manuales de microbiología recomendaciones para la preparación de medios de cultivo con el fin de estandarizar el procedimiento dentro del Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos, y que este produzca consistentemente medios que cumplan con las especificaciones de calidad preestablecidas. Además, se validó este procedimiento para los medios - utilizados en la prueba de recuento microbiano- realizando pruebas a los atributos de calidad críticos para los medios de cultivo, entre ellos la inspección visual (buscando signos de deshidratación o cambios en la coloración), el pH y la promoción de crecimiento de los medios de cultivo. Como resultado de esta validación, se tiene que el procedimiento de elaboración de los medios agar tripticosa soya y caldo tripticosa soya son totalmente validados, mientras que el agar Sabouraud dextrosa se puede asegurar que este puede darse la promoción adecuada de hongos y levaduras, como corresponde. Por otra parte, se evaluó la estabilidad para darle un vencimiento a los medios de cultivo elaborados, dando como período de validez de 3 meses.

Por otro lado, como necesidad del laboratorio se tiene la actualización del instructivo de la prueba de recuento microbiano para productos farmacéuticos no estériles, por lo que se generan cambios en los siguientes dos aspectos: la formulación del medio de cultivo líquido para la dilución 1:10 de las muestras; y en la pesada de muestras en *pool* en lugar de pesar 3 muestras individualmente. Esta prueba se verificó su viabilidad mediante la prueba de Aptitud del Método en 4 productos farmacéuticos, los cuales son: ungüento de ácido salicílico, crema de rosas, jarabe de clorfenamina y polvo de colestiramina. Los análisis de prueba dieron un resultado conforme para la realización de la prueba.

Palabras Clave:

Recuento Microbiano, medios de cultivo, estudios de estabilidad, aptitud del método de recuento.

MARCO TEÓRICO DE REFERENCIA

De acuerdo con Ley 6219, Art. 4, publicado en la Gaceta No. 88, el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos (LNCM) es un ente de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) en la que utiliza *los métodos de la farmacopea internacional y las normas que dicte la Organización Mundial de la Salud para medicamentos. Este funciona como oficial del Ministerio de Salud a requerimientos de éste, de conformidad con un convenio que para estos efectos deberán formalizar el Ministerio y la CCSS.* (1) Además, la Ley 6577, Art 8, en la Gaceta No. 97 declara al LNCM un carácter oficial, por lo que *las partidas rechazadas por este laboratorio deben ser destruidas o reexportadas, a juicio del Ministerio de Salud.* (1) La mayoría de los medicamentos entrantes a la institución CCSS, son analizados por el LNCM y dentro de la institución circula una gran parte de los medicamentos del país, he allí la importancia de este laboratorio en Costa Rica en cuanto al área de medicamentos.

Aunado a lo anterior, el Laboratorio de Normas se encuentra acreditado bajo el código de acreditación número LE-127 a partir de marzo 2016 conforme con la norma INTE-ISO/IEC 17025:2005 requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración, esto aumenta la confianza por parte del laboratorio hacia sus clientes directos e indirectos, así como a los proveedores de medicamentos. (2)

Por otro lado, dentro de LNCM se encuentra organizado según el área de actividad, sea soporte técnico, administrativo y tecnologías de información y comunicación. Dentro de las unidades técnicas (Unidades Operativas) se encuentran: Bioanálisis (BA), Ingreso (I), análisis Químico-Farmacéutico (AQF), Precalificación Técnica de Medicamentos (PTM), Coordinación Externa de la Calidad (CE) y Garantía Interna de la Calidad (GIC), cada una de ellas a cargo de un coordinador farmacéutico y éstas a su vez se encuentran a cargo de la jefatura de subárea de Control de Calidad y ésta a cargo de la Jefatura del LNCM. Se puede notar que, en este laboratorio, el papel principal es de los profesionales farmacéuticos, puesto que ellos son los competentes para la materia en medicamentos. (1)

Entre las evaluaciones en LNCM se realizan pruebas fisicoquímicas-farmacéuticas, como la identificación, potencia, valoración, ensayo, disolución, uniformidad de contenido o determinación de impurezas mediante técnicas de HPLC, TLC, UV-Vis, Absorción Atómica, Volumetrías u otros. También se realizan pruebas físicas como la inspección de atributos de calidad, determinación de pH, volumen de entrega, llenado mínimo, determinación de partículas visibles y subvisibles, ranurado funcional, verificación de aditamentos, friabilidad de tabletas, determinación de contenido en empaque primario y determinación de volumen en inyectables. Además, se realizan pruebas biológicas o microbiológicas farmacéuticas de potencia, valoración y/o uniformidad de contenido por método de cilindro-placa o turbidimetría; endotoxinas bacterianas por coagulación *gel-clot*, determinación de proteínas totales, recuento microbiano, microorganismos específicos y esterilidad. (1, en Anexo 3)

Ahora bien, según las Normas Complementarias de la Facultad de Farmacia de La Universidad de Costa Rica sobre los Trabajos Finales de Graduación, los objetivos de la práctica dirigida son los siguientes (3):

Objetivos Generales

1. Aplicar los conocimientos, destrezas, habilidades y valores adquiridos en la carrera en el campo farmacéutico, como complemento a la formación académica.
2. Impulsar la ejecución de una investigación que ayude a resolver un problema o necesidad del Centro de Práctica.

Objetivos Específicos

1. Integrar al estudiantado en el ámbito laboral del Centro de Práctica para permitir un desarrollo óptimo de su ejercicio profesional posterior, como parte de un equipo de trabajo.
2. Dirigir al estudiantado en su propia educación y estimular los hábitos y prácticas de observación, análisis y resolución de problemas, disciplina, responsabilidad e investigación.
3. Fomentar el intercambio de criterios y opiniones como resultado del contacto con integrantes del equipo de trabajo y con profesionales afines.
4. Promover una actitud ética y profesional en las relaciones con pacientes, personal técnico, profesionales en farmacia y profesionales en el campo de la salud y áreas afines.
5. Estimular la capacidad investigativa de cada estudiante por medio de la elaboración de un protocolo de investigación y su ejecución.
6. Fomentar la divulgación de los resultados de los proyectos de investigación ejecutados.

MEMORIA DE ACTIVIDADES DE LA PRÁCTICA DIRIGIDA

La descripción de las actividades realizadas en el centro de práctica para cumplir los objetivos del plan de práctica dirigida se halla en el siguiente cuadro:

Tabla 1. Registro de Actividades en el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos.

Área del LNCM	Fecha	Actividad
GIC	2019-01-02 M	Dr. Omar Moya explicó acerca de reglamentos básicos dentro del laboratorio, así como se asignó lecturas del Manual de Calidad, algunos Procedimientos e Instructivos (total de 6 Documentos Oficiales más anexos adjuntos) Se leyeron 3 documentos.
Ingreso	2019-01-03 J ~2019-01-11 V	Se leyó Instructivos de la Unidad Operativa de Ingreso; por ejemplo: Inspección por atributos de Tabletas, Cápsulas, Polvos sólidos.
Ingreso	2019-01-04 V	Se asignó el proyecto de Ingreso de lectura del Capítulo 1790 con el fin de establecer cambios (si los hay) del procedimiento de Inspección de Partículas Visibles.
Ingreso	2019-01-07 L ~ 2019-01-14 V	Lectura del Capítulo 1790 sobre Inspección Visual de Inyectables (nuevo capítulo incorporado en la USP41). Realización de la presentación sobre el Capítulo 1790 del USP41.
Ingreso	2019-01-15 K	Capacitación al personal del área de Ingreso acerca del Capítulo 1790 sobre Inspección Visual de Inyectables y las recomendaciones relacionadas con estas pruebas.

Ingreso	2019-01-15 K ~ 2019-01-25 V	Realizar pruebas junto con los técnicos. Lectura de un libro sobre una lista de defectos visuales en empaques primarios y secundarios.
UPTM/CE	2019-01-24 J	Reunión con Dra. Lynette Caravaca y el Dr. Alejandro Murillo.
Ingreso	2019-01-25 V	Terminar la entrega de lotes de sueros fisiológicos, pruebas realizadas junto con técnicos acerca de Inspección de Partículas Visibles y Partículas Subvisibles. Empezar con la Inspección por Atributos de un medicamento oncológico.
Ingreso	2019-01-28 L	Terminar de entregar hojas de análisis de la prueba de Inspección por Atributos de área de Ingreso.
BA	2019-01-28 L	Dr. Mario Oreamuno explicó introducción al área de Bioanálisis y se especificó el proyecto para realizar el Proyecto de Graduación. Asignación de lectura del Capítulo 61, 62 y 71 de la USP-36 versión español.
BA	2019-01-29 K	Observación de la Prueba de Potencia Antimicrobiana. Se leyó el Instructivo de la Prueba de Promoción de Crecimiento versión nueva realizada por el Dr. Oreamuno y se dieron algunas recomendaciones para renovación del instructivo.
BA	2019-01-30 M	Preparación de Medios de Cultivo con Roberto Navarro.
BA	2019-01-31 J	Ayudar en la Prueba de Potencia Antimicrobiana por metodología Cilindro-Placa realizando las diluciones, con Dr. Julio Murillo.

UPTM/CE	2019-01-31 J	Se coordinó reunión con el Dr. Alejandro Murillo y la Dra. Lynette Caravaca para la realización de un proyecto de Gluten.
BA	2019-02-01 V	Observación de la Prueba de Endotoxinas realizada por el Dr. Esteban Castiglioni. Acordar fecha de reunión para Proyecto Gluten. Asignación investigación de requisitos para validación de autoclaves, clasificación de todos los ciclos de esterilización.
BA	2019-02-04 L	Escribir la Metodología del Proyecto de Bioanálisis para el Trabajo Final de Graduación.
BA	2019-02-05 K	Observación de la Prueba de Esterilidad realizada por Dra. Priscilla Hernández. Investigación acerca de diferencias entre Tween-20 y Tween-80. Investigación de requisitos mínimos de una validación de Autoclaves.
BA	2019-02-07 J	Revisión del Capítulo 61 y 62 de la USP. Escribir Metodología de Proyecto Bioanálisis.
BA	2019-02-08 V	Realización de esquema de procedimiento, así como el cronograma de trabajo del Proyecto. Se coordinó para obtener las muestras del proyecto. Se discutió con tutor para dar enfoque al proyecto. Reunión con Dra. Lynette y Dr. Alejandro acerca del proyecto de Gluten.
BA	2019-02-11 L	Revisión de Procedimiento del proyecto de graduación con Dr. Oreamuno y Dr. Rojas.
BA	2019-02-12 K	Preparación de Medios de Cultivo para el proyecto de graduación.

Ingreso	2019-02-13 M	Observación de una Apelación de unas muestras en la prueba Inspección de Partículas. Obtención de las Muestras para Recuento Microbiano del proyecto.
BA	2019-02-14 J	Recuento Microbiano Lote 1. Aptitud del Recuento Microbiano Lote 1. Promoción de Medios para Estudio de Estabilidad Lote 1.
BA	2019-02-15 V	Aptitud del Recuento Microbiano (II Parte). Evaluación Microbiológica Pasiva. Muestreo de Áreas. Lectura de Placas Recuento Microbiano.
BA	2019-02-18 L	Lectura de Placas Promoción, Aptitud, Recuento.
BA	2019-02-19 K	Planeación de Flujo de Trabajo para continuación proyecto.
BA	2019-02-20 M	Preparación de Medios de Cultivo.
BA	2019-02-21 J	Aptitud (Repetición <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i>) y Promoción de los medios. Observación de Prueba de Identificación de Microorganismos con técnica de Tinción de Gram y utilizando el equipo Vitek, realizada por el Dr. Rudy Rojas.
BA	2019-02-22 V	Lectura de resultados de Aptitud y Promoción. Evaluaciones Microbiológicas de las áreas del UO Bioanálisis. Lectura de placas Recuento.
BA	2019-02-25 L	Preparación de medio de cultivo para el proyecto. Lectura de resultados de Aptitud y Promoción.
BA	2019-02-27 M	Preparación de medios cultivo. Preparación de cubrebocas y cubre-cabellos para esterilidad.

BA	2019-02-27 M	Capacitación acerca del LNCM-IT-081-1 sobre la "Clasificación, tratamiento y disposición de los residuos", impartido por el Dr. Mario Oreamuno. Capacitación magistral sobre LNCM-IT-055-3 "Eliminación de desechos del laboratorio de Bioanálisis" explicado por el Dr. Rudy Rojas.
ALDI BA	2019-02-28	Visita al Almacén General de la CCSS para muestreo de una apelación a reclamos. Registro Resultados de Aptitud y Recuento.
BA	2019-03-04 L	Promoción de medios.
UPTM	2019-03-04 L	Explicación de revisiones de solicitudes de precalificación por la Dra. Erika Lastres. Lectura de los instructivos de UPTM y Procedimiento correspondiente a la entrada de solicitudes para la precalificación de medicamentos (LNCM-IT-153-1, LNCM-IT-154-2, LNCM-IT-231-1, LNCM-PT-027-5)
Cartago ALDI Frigoríficos	2019-03-05 K	Compra del recipiente metálico para elaborar el medio de cultivo de 20 Litros. Visita al ALDI y Frigoríficos.
UPTM	2019-03-05 K	Lectura de instructivos de UPTM.
UPTM	2019-03-06 M ~ 2019-03-07 J	Revisión de una solicitud de precalificación de tipo "Renovación"
UPTM	2019-03-08 V	Asignación del trabajo del "traslado de expedientes" Revisión de solicitud de precalificación tipo "reingreso con muestra"
Ingreso	2019-03-08 V	Auto-lectura LNCM-IT-227-1 Inspección por atributos de Productos Farmacéuticos.

UPTM	2019-03-11 L~ 2019-03-27 M	Traslado de expedientes digitales desde “Informes Técnicos” hacia “Solicitudes de Precalificación”	
BA	2019-03-11 L	Elaboración de un lote de 20 Litros de caldo tripticasa de soya con Polisorbato 80.	
BA	2019-03-12 K	Promoción de Medios.	
BA UPTM	2019-03-13 M	Lectura de Placas. Capacitación acerca de los cambios en el LNCM-MC-001-7 “Manual de Calidad” impartido por Dr. Omar Moya y en el LNCM-PT-010-5 “Personal” impartido por Dr. David Alfaro.	
UPTM	2019-03-14 J	Capacitación Complementaria de “Mapeo de Temperatura y Humedad” implementado por Dr. Mario Sánchez	
UPTM	2019-03-18 L	Reunión de Apertura de Auditoría del ECA por Rebeca Arguedas.	
UPTM	2019-03-19 K	Reunión de Cierre de Auditoría del ECA por Rebeca Arguedas.	
UPTM	2019-03-28 J ~ 2019-03-29 V	Revisión de Expediente de Precalificación.	
AQF	Análisis en HPLC de:		
	2019-04-01 L ~ 2019-04-03 M	Granisetrón HCl	ID-1947-2019
		Lidocaína	ID-2001-2019 ID-2004-2019
	2019-04-04 J	Sacarina	ID-2009-2019
	2019-04-08 L	Dextrometorfano HBr	ID-2077-2019 ID-2080-2019 ID-2083-2019
	2019-04-09 K	Betametasona Valerato	ID-2135-2019
	2019-04-10 M	Fentanilo	ID-2310-2019

			ID-2312-2019
	Bajo Supervisión de: <ul style="list-style-type: none"> • <u>Analista</u>: Luis Alfredo Campos Segura. • <u>F3</u>: Dr. Arturo Sancho Garita. 		
AQF	2019-04-08 L	Capacitación acerca de “LNCM-IT-213-4 Verificación de métodos” impartido por Dr. David Alfaro.	
AQF	2019-04-16 K	Test de Disolución de: <ul style="list-style-type: none"> • Prednisolona Tabletas <ul style="list-style-type: none"> ○ ID-2119-2019 ○ ID-2120-2019 Con Analista: Luis Alfredo Campos Segura.	
AQF	Análisis en HPLC de:		
	2019-04-15 M~	Carvedilol Tabletas	ID-2294-2019
	2019-04-17 V		ID-2296-2019
	Bajo Supervisión de: <ul style="list-style-type: none"> • <u>Analista</u>: Irina María Córdoba Alfaro. • <u>F2</u>: Dr. Eduardo Cordero Jiménez. 		
AQF	Análisis en HPLC de:		
	2019-04-23 K	Lamivudina	ID-2304-2019
	2019-04-24 M	Hidroclorotiazida	ID-2251-2019
			ID-2256-2019
			ID-2262-2019
ID-2266-2019			
	Bajo Supervisión de: <ul style="list-style-type: none"> • <u>Analista</u>: Luis Alfredo Campos Segura. • <u>F3</u>: Dr. Arturo Sancho Garita. 		
AQF	2019-04-29 L	Rotar a Subárea de “Varios” en pruebas UUD, UV, Absorción Atómica.	
	2019-04-30 K	Miconazol Nitrato Óvulos	ID-2407-2019

			ID-2408-2019
	2019-05-02 J	Metildopa	ID-2412-2019
	2019-05-03 V	Litio y Carbonato	ID-2551-2019
AQF	2019-05-03 V	Capacitación complementaria “Sinergia AQF-Lavado de Cristalería y el Trabajo en Equipo” impartido por Sra. Grettel Arias Rodríguez.	
CE	2019-05-06 L ~ 2019-05-07 K	<p>Curso de Gestión de Suministros de Medicamentos y otros insumos en almacenes locales de medicamentos: En la cual se habla del laboratorio LNCM, las Buenas Prácticas de Almacenamiento y Distribución, el mapeo de temperaturas y áreas de almacenamiento y áreas de análisis.</p> <p>“Liderazgo aplicado al proceso de verificación y Control de la Calidad de los Medicamentos: Administración y Gestión de Mapeos de Temperatura y Humedad. Análisis de Casos.” Impartido por Dra. Tatiana Mata.</p> <p>“Gestión de compras de termohigrómetros y servicios de calibración” impartido por Ing. Mario Morales Castro.</p>	
CEC	2019-05-08 M~ 2019-05-10 V	Solicitud y revisión de Certificados de Análisis (CoA) y verificación con respecto a las metodologías de análisis.	
CE	2019-05-13 L	Descripción del proceso de Ingreso de Reportes de Fallas Farmacéuticas con la Dra. Dunnia Blanco.	
CE	2019-05-14 K	Lectura del LNCM-IT-201-7 Instructivo Manejo Reportes por Falla Farmacéutica.	

CE	2019-05-16 J	Descripción del proceso de los medicamentos PVP para el APROBADO por Dr. Alejandro Murillo.
CE	2019-05-17 V	Capacitación complementaria sobre “Aspectos relacionados a la Calidad del Vidrio en envases farmacéuticos” impartido por Sr. Patricio Zepeda invitado del Laboratorio Stantech.
CE	2019-05-28 K	Descripción del proceso EDP (Evaluación del Desempeño de Proveedores) por el Dr. Esteban Castiglioni.
CE	2019-05-13 L ~ 2019-06-07 V	Ingreso y resolución de Reportes de Fallas Farmacéuticas. Ingreso y atención de Investigaciones Extraordinarias Solicitadas (Consultas). Atención de un Rechazo Post-distribución. Revisión de CoA de los medicamentos PVP. Elaborar Notas de Cierre (0233Q2019).
CE	2019-05-30 J	Capacitación Obligatoria sobre “Metrología para la Vida” Anexo 1 LNCM-PT-034-4, impartido por Dr. David Alfaro.
CE	2019-06-11 K	Documentos de Autolectura: LNCM-IT-101-3 Clasificación de reactivos y consideraciones de seguridad impartido por Francisco Palma Soto.
LSP	2019-06-17 L ~ 2019-06-21 V	Visita en el Laboratorio de Soluciones Parenterales. Conocer acerca del proceso de la purificación de agua antes de utilizarse como materia prima de los productos parenterales. Conocer los análisis químicos y microbiológicos que se realizan al producto terminado y al agua

		<p>antes de empezar con la fabricación de los medicamentos.</p> <p>Conocer el proceso de fabricación: las áreas limpias donde se encuentra el granel (los tanques), el llenado y área de impresión donde suministra al área de llenado. También el área de empaclado secundario, esterilización y empaclado terciario. Además, se conocieron los puntos de control del proceso, verificación del proceso y control de calidad.</p> <p>En el área de Garantía de Calidad implementación de hojas de cálculo no editables para la documentación de registros internos.</p>
GIC	2019-06-24 L ~ 2019-06-28 V	<p>Dr. Omar Moya explicó acerca conceptos de validación, certificación, calidad, repaso del Manual de Calidad. Además, explicó acerca de la unidad de Garantía y la importancia de esta unidad en el Laboratorio de Normas.</p> <p>Registro de <i>Software</i>, <i>Firmware</i> e instructivos específicos relativos a los equipos del LNCM. Esto aunado a que en USP recomienda la validación del <i>software</i> de los equipos y al menos el registro de los cambios de versiones utilizados de los sistemas de estos.</p>

Significado de las Siglas:

GIC: Garantía Interna de Calidad.

UPTM: Unidad de Precalificación Técnica de Medicamentos.

CE: Coordinación Externa de la Calidad.

BA: Unidad de Bioanálisis.

ALDI: Almacén General de Distribución de Medicamentos ubicado en San Francisco de Dos Ríos.

Frigoríficos: Almacén de Frigoríficos ubicado en el Hospital México.

AQF: Unidad de Análisis Químico-Farmacéutico.

CEC: Unidad de Confección de Expedientes de Calidad.

LSP: Laboratorio de Soluciones Parenterales ubicado en Heredia.

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Mejora en el proceso de la prueba de
Recuento Microbiano
para Productos Farmacéuticos No Estériles en
el Laboratorio de Normas y Calidad de
Medicamentos de la
Caja Costarricense de Seguro Social.**

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La Unidad de Bioanálisis del Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos (LNCM) de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) es uno de los departamentos de dicho laboratorio, encargada de ejecutar pruebas para verificar la calidad y seguridad de los medicamentos que adquiere la Institución. Entre las pruebas que se realizan se encuentran las pruebas de Control Higiénico a Productos Farmacéuticos No Estériles; la prueba del recuento microbiano es una de las principales pruebas realizadas dentro de dicha unidad operativa. Para la ejecución de la misma se utilizan varios medios de cultivo, los cuales se preparan con alta frecuencia en la misma unidad; sin embargo, la duda se halla en si ¿se puede estandarizar el método de preparación de los medios de cultivos de tal forma que se asegure que los mismos cumplen consistentemente con las especificaciones establecidas para promover un crecimiento óptimo de los microorganismos? y bajo las condiciones de almacenamiento disponibles en el laboratorio, ¿cuánto tiempo pueden almacenarse los medios, una vez preparados, de forma que mantengan sus características y propiedades originales dentro de las especificaciones mínimas para poder utilizarse?

De igual manera, el instructivo técnico del Laboratorio correspondiente a la prueba de recuento microbiano se encuentra en proceso de actualización; empero, ¿cuál es el método actualizado e internacionalmente recomendado para la prueba de recuento microbiano? y ¿será posible aplicarlo y validarlo en el laboratorio de Normas y Calidad de medicamentos para el control higiénico de productos no estériles?

Ubicación del Proyecto:

- **Área de Investigación:** Bioanálisis de medicamentos.
- **Materia de Investigación:** Control de Calidad de Medicamentos.
- **Cobertura del Proyecto:** Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos de la Caja Costarricense del Seguro Social.

JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos (LNCM) de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), es un ente *“oficial y especializado que evalúa la conformidad de la calidad de productos farmacéuticos, de forma ética, confiable y oportuna para que la CCSS brinde a la población medicamentos que cumplan las especificaciones de calidad reconocidas internacionalmente y oficiales en Costa Rica”* (1). Como ente oficial costarricense del control de medicamentos y de reconocimiento internacional, es necesario emplear el mejor proceso posible dentro del laboratorio cumpliendo con las especificaciones y métodos adecuados, así como tener el control de todos los procesos, como la calificación de los equipos, el personal, las áreas de operación y la documentación, entre otros. (4)

La Unidad de Bioanálisis (UBA) del LNCM se encuentra en un auge de cambios constantes para la mejora continua de los procesos de análisis con el fin de verificar la calidad de los medicamentos, mediante pruebas de control higiénico, así como la identificación y cuantificación de antibióticos, entre otros. La prueba de Control Higiénico de Productos Farmacéuticos No Estériles es una de las pruebas diseñadas para verificar la calidad y seguridad de los medicamentos, los cuales deben cumplir con una especificación establecida para la calidad microbiológica del producto dirigido a sus clientes; es decir, los pacientes. (1)

Como unidad especializada en ejecutar métodos bioanalíticos a los productos farmacéuticos, le es de suma importancia contar con medios de cultivo calificados, preparados mediante un procedimiento estandarizado y validado según las necesidades de producción de dicha Unidad.

La variabilidad inherente al proceso de preparación de medios de cultivos aunado a posibles diferencias en la preparación -por ejemplo, la variabilidad dependiendo del técnico encargado- apoyan la necesidad de contar con un método estandarizado de preparación. El laboratorio actualmente cuenta con un Instructivo Técnico (IT) de preparación de medios de cultivo (5); sin embargo, se requiere actualizar con las mejores prácticas de fabricación según lo establecido en las farmacopeas vigentes, en normativas internacionales y otras fuentes reconocidas. Asimismo, se requiere

validar dicha metodología; es decir, establecer evidencia documentada reciente que proporcione un alto grado de certeza al laboratorio de que este procedimiento estandarizado produzca consistentemente medios de cultivo que cumplan con las especificaciones de calidad preestablecidas.

Por otro lado, la estandarización y validación del procedimiento de preparación de los medios debe contemplar los tamaños de lote propuestos y requeridos según las necesidades existentes en el laboratorio. Actualmente, se prepara una cantidad de 9 litros de caldo tripticasa de soya aproximadamente dos veces a la semana, así como 5 litros semanales de cada uno de los agares (tripticasa de soya y Sabouraud dextrosa), para suplir las necesidades de las pruebas de recuento microbiano, por lo que es necesario evaluar la preparación de estos medios con esos tamaños de lote.

Asimismo, basado en que la Unidad requiere aumentar el tamaño de lote de medio producido con el fin de disminuir la frecuencia de fabricación, y tomando en cuenta la capacidad de los equipos existentes -autoclaves, recipientes de preparación, entre otros-, así como las necesidades futuras en caso de implementar la metodología propuesta para la prueba de recuento microbiano que se discutirá más adelante, se requiere estandarizar y validar la preparación de caldo tripticasa soya en un tamaño de 20 L.

La elaboración de medios en la frecuencia y cantidades mencionadas anteriormente implica contar con espacios de almacenamiento con la suficiente capacidad y con los controles requeridos de temperatura. La Unidad de Bioanálisis cuenta con 2 cámaras de refrigeración donde actualmente se almacenan todos los medios preparados; sin embargo, su capacidad no es suficiente para almacenar los medios en las cantidades propuestas. El laboratorio cuenta, además, con una bodega de almacenaje de reactivos e insumos para Bioanálisis, en condiciones normales de temperatura y humedad, misma que representa una opción factible para el almacenaje de los medios preparados.

Por tal razón, es necesario poner a prueba la estabilidad de los medios una vez preparados, almacenándolos en las dos condiciones disponibles en el laboratorio -refrigeración y condiciones normales-, de esta manera establecer evidencia

documentada del periodo de validez de cada medio, para cada una de las condiciones de almacenamiento mencionadas a los 15 días, 30 días, 60 días y 90 días después de la elaboración del medio mediante el método estandarizado y propuesto.

De igual manera, el laboratorio cuenta con un instructivo técnico para la ejecución estandarizada de la prueba de recuento microbiano, mismo que se encuentra en período de modificación, por lo que el laboratorio requiere actualizar su metodología de acuerdo con lo establecido en los libros oficiales vigentes. (5)

Una vez actualizada la metodología según los requisitos farmacopeicos actuales, es necesario establecer la evidencia que respalde que, el método de recuento microbiano actualizado es capaz de detectar y cuantificar los microorganismos, aplicado en productos de formas farmacéuticas analizadas con mayor frecuencia en el Laboratorio. Esta prueba confirma la aptitud del método de recuento microbiano en su totalidad, incluyendo el personal, el ambiente, las cepas microbianas y el medio de cultivo; todo en presencia del producto farmacéutico y en las condiciones dentro del laboratorio. (6,7) Por esta razón, la garantía de la prueba de Control Higiénico de Productos Farmacéuticos está en la Aptitud del Método de Recuento Microbiano.

De acuerdo con los registros del laboratorio del área de bioanálisis del año 2018, entre los productos analizados con mayor frecuencia se encuentran cremas, ungüentos, soluciones orales y polvos para suspensión. Por ende, se examinará un medicamento de cada una de las formas farmacéuticas mencionadas, es decir, crema de rosas, ungüento de ácido salicílico, jarabe de clorfenamina y polvo de colestiramina.

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo General

- Mejorar el proceso de la prueba de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles dentro de la Unidad de Bioanálisis del Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos de la Caja Costarricense de Seguro Social, desde la preparación y estabilidad de los medios de cultivo, hasta la metodología de análisis de la prueba de recuento microbiano.

Objetivos Específicos

- Identificar las mejores prácticas y recomendaciones internacionales para establecer un método estandarizado para la fabricación de los medios de cultivo utilizados en la prueba de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles en el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos.
- Validar el proceso de fabricación de medios de cultivo utilizados en la prueba de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles, para demostrar de que cumplen consistentemente con las especificaciones y características de calidad predeterminadas.
- Evaluar la estabilidad de los medios de cultivo preparados para establecer un período de validez bajo condiciones de almacenamiento normales y de refrigeración.
- Proponer una metodología actualizada para la prueba de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles, y aplicarla a cuatro productos farmacéuticos de análisis rutinario para verificar su viabilidad en el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos.
- Verificar la aptitud del método actualizado de la prueba de Recuento Microbiano de cuatro productos farmacéuticos no estériles: crema de rosas, ungüento de ácido salicílico, jarabe de clorfenamina y polvo de colestiramina.

MARCO TEÓRICO

Las pruebas en la Unidad de Bioanálisis requieren, en gran proporción, medios de cultivo para el análisis de los productos farmacéuticos. A continuación, se detallan generalidades acerca de los medios de cultivo.

Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son mezclas que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Los microorganismos no pueden estudiarse individualmente debido al tamaño minúsculo que poseen, por lo que se identifican en poblaciones o colonias y estos medios permiten que se dé la replicación de las células individuales hasta formarse las Unidades Formadoras de Colonias o UFC. (8)

1. Clasificación de Medios de Cultivo basados en la consistencia

Según la consistencia del medio de cultivo, éstos se pueden dividir en tres tipos (8-10):

1.1. Medios de Cultivo Líquidos

Este tipo de medios se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente, por lo que se les llama “caldos” y están contenidos en tubos de ensayo, botellas o frascos. En medio líquido, las bacterias crecen uniformemente produciendo turbidez general como en el Caldo Trypticase de Soya. Por otro lado, los medios líquidos tienden a usarse cuando hay que cultivar una gran cantidad de bacterias o cuando se sospecha que los números del inóculo son bajos. Al inocular en el medio líquido ayuda a diluir cualquier inhibidor del crecimiento bacteriano y por esta razón, en el recuento microbiano se debe de colocar una cantidad del producto en un caldo para poder aumentar el crecimiento e inhibir los preservantes (utilizados frecuentemente para mantener el medicamento hasta la fecha de vencimiento). El cultivo en medio líquido se puede utilizar con el fin de obtener un recuento viable por medio de dilución de la muestra. (9,10)

Una limitante de los medios líquidos y es el hecho de que las propiedades de las bacterias no son visibles en los caldos, por lo que no es posible detectar la presencia de más de un tipo de bacteria. (10)

1.2. Medios de cultivo Sólidos

Usualmente se les llama “agares” y están contenidos en un tubo de ensayo, frasco o placas de Petri destinados al ensayo. Los medios sólidos son útiles para aislar bacterias o para determinar las características de la colonia aislada; adicionalmente, es posible contar las UFC cuando estas son suficientemente separadas entre sí. Es necesario tomar en cuenta que los medios líquidos se pueden pasar a medios sólidos, mediante la adición de ciertos agentes solidificantes como agar-agar (simplemente llamado agar), el cual es el agente solidificante más utilizado. Este es un polisacárido no ramificado obtenido de las membranas celulares de algunas especies de algas rojas, como el género *Gelidium*. El agar está compuesto por dos polisacáridos de cadena larga (70% de agarosa y 30% de agarpectina) y se funde a 95 °C y se solidifica a 42 °C. Se debe considerar que el agar-agar no aporta ninguna propiedad nutritiva, no es hidrolizado por la mayoría de las bacterias y generalmente está libre de sustancias que estimulan el crecimiento o retardan el crecimiento; sin embargo, puede ser una fuente de calcio e iones orgánicos. Esta última cualidad es una gran ventaja debido a que se pueden cuantificar los UFC siempre y cuando los componentes de los caldos posean los nutrientes aptos para el crecimiento, mientras que el agar-agar estabiliza el crecimiento en un sitio fijo. (9,10)

Por otro lado, las propiedades del agar dependen del lugar de extracción; por ejemplo, el agar de Nueva Zelanda tiene más capacidad de gelificación que el agar japonés. Generalmente, cuando son medios sólidos se usan en una concentración de 1 - 3% para hacer un medio de agar sólido. Debido a estas variaciones y la ausencia de información acerca de materias primas de los proveedores de los medios deshidratados, es necesario realizar pruebas de promoción a cada lote de medio deshidratado. (9,10)

1.3. Medios de Cultivo Semisólidos

Este tipo de medios, al igual que los medios sólidos, utilizan agar como gelificante, la única diferencia radica en su concentración 0,2 – 0,5%. Estos medios son bastantes blandos y son utilizados para demostrar la motilidad de bacterias microaerofílicas y separar las móviles de las cepas no móviles. (9,10)

1.4. Medios de Cultivo Difásicos

A veces, un sistema de cultivo se compone de medio líquido y sólido en la misma botella. El inóculo se agrega al medio líquido y, cuando se hacen los subcultivos, la botella se inclina simplemente para permitir que el líquido fluya sobre el medio sólido. Esto evita la necesidad de abrir frecuentemente la botella de cultivo al subcultivo. (9)

2. Clasificación de Medios de Cultivo basados en la composición

2.1. Medios Sintéticos o Químicamente definidos

Los medios químicamente definidos son preparados a partir de ingredientes purificados y, por tanto, su composición exacta es conocida. El medio sintético puede ser simple o complejo dependiendo del suplemento incorporado en él para el crecimiento de los microorganismos específicos o no. (10)

2.2. Medios No-Sintéticos o Químicamente indefinidos

El medio no sintético contiene al menos un componente que no está ni purificado ni completamente caracterizado, ni siquiera completamente consistente de un lote a otro. Estos a su vez se dividen en simples (aquellos capaces de satisfacer los requerimientos de nutrientes de organismos que requieren relativamente pocos factores de crecimiento) y complejos (los que apoyan el crecimiento de microorganismos más exigentes). (10)

3. Clasificación de Medios de Cultivo basados en la función, propósito o aplicación

3.1. Medios Basales

Los medios basales son medios simples compatibles con la mayoría de las bacterias no fastidiosas. Estos medios se utilizan generalmente para el aislamiento primario de microorganismos. (10)

3.2. Medios Enriquecidos

La adición de nutrientes adicionales (provenientes de la sangre, suero, yema de huevo, soya u otros) al medio basal los convierte en medios enriquecidos, los cuales se utilizan para cultivar bacterias exigentes desde el punto de vista nutricional. (10)

3.3. Medios Enriquecidos y Selectivos

Estos están diseñados para inhibir las bacterias comensales o contaminantes no deseadas y ayudan a recuperar un microorganismo específico de una mezcla de bacterias. Los medios selectivos pueden ser líquidos o sólidos a base de agar, pero cumple con el mismo propósito. Cualquier medio de agar se puede hacer selectivo mediante la adición de ciertos agentes inhibidores que no afecten al microorganismo de interés. (10)

4. Medios de Cultivo en el Recuento Microbiano

De acuerdo con capítulo <61> de la Farmacopea de los Estados Unidos, la Farmacopea Japonesa y Farmacopea Europea (armonizados con ICH), la prueba de Recuento Microbiano en Productos Farmacéuticos No Estériles utiliza los siguientes medios de cultivo (7):

4.1. Agar Trypticase de Soya (ATS)

El agar tripticase de soya es un medio sólido enriquecido no selectivo, el cual debe estar en un rango de pH de $7,3 \pm 0,2$ (25°C) y presenta la siguiente composición:

Digerido Pancreático de Caseína	15,0 g
Digerido Papaínico de Soya	5,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua Purificada	1000 mL

La combinación de caseína y peptonas de soya hace al medio nutritivo por suministrar nitrógeno orgánico (aminoácidos y péptidos de cadena más larga). El NaCl mantiene el equilibrio osmótico. (11)

Los frascos de medio deshidratado intactos o ya abiertos deben almacenarse en un lugar oscuro entre 5-25 °C, sin congelar ni sobrecalentar, así mantienen su estabilidad hasta la fecha de vencimiento. Para fundir el medio de cultivo, se pueden utilizar varios métodos, los cuales son el uso de un baño maría, el uso de un ciclo de autoclave o el uso de hornos de microondas; sin embargo, los fabricantes de medios y normativas internacionales no recomiendan la práctica del último método debido a la distribución desigual del proceso de calentamiento. Según algunos fabricantes de medios deshidratados, cuando se preparan placas como las usadas para los controles ambientales, se recomienda para una placa de 9-10 cm, agregar 19-21 mL de volumen de medio y almacenar de un día para el otro a 18-23°C; además, las placas preparadas de este medio pueden ser utilizadas durante 5 - 7 días. (11,12)

El ATS no se utiliza para el aislamiento de patógenos a partir de muestras clínicas, pero puede ser utilizado para el cultivo de cepas bacterianas no exigentes y moderadamente exigentes como las *Enterobacteriaceae*, bacilos gran negativos no fermentadores (ej. *Pseudomonas*), enterococos, estafilococos, bacterias formadoras de esporas (ej. *Bacillus*). (11)

Una consideración importante es que el ATS sin suplementar no contiene compuestos capaces de neutralizar activamente los desinfectantes y conservantes. Si se deben controlar muestras con dichos compuestos o superficies previamente desinfectadas, se recomienda utilizar ATS con lecitina y polisorbato. (11)

4.2. Agar Sabouraud Dextrosa (ASD)

El agar Sabouraud dextrosa es un medio sólido enriquecido no selectivo, el cual debe estar en un rango de pH de $5,6 \pm 0,2$ (25°C) y presenta la siguiente composición:

Dextrosa	40,0 g
Mezcla de Digerido Péptico de Tejido Animal y Digerido Pancreático de Caseína (1:1)	10,0 g
Agar	15,0 g
Agua Purificada	1000 mL

Esta combinación fue diseñada por Sabouraud especialmente para el cultivo de dermatofitos ya que un pH bajo de aproximadamente 5,6 favorece el crecimiento de hongos, en especial los dermatofitos, con efecto ligeramente inhibitor para las bacterias contaminantes en muestras clínicas. (13)

La combinación con peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados, mientras que la dextrosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos, sobre todo hongos y levaduras como *Aspergillus niger* o *Candida albicans*, aunque también puede permitir el crecimiento de bacterias en menor cantidad. Es posible que algunos hongos (por ejemplo, *Blastomyces dermatitidis*) no se recuperen en este medio debido al alto contenido de carbohidratos. (13)

Según fabricantes de medios deshidratados, este medio de cultivo permite una incubación de microorganismos de hasta 6 semanas y todos los cultivos deben examinarse al menos una vez por semana para ver si presentan crecimiento fúngico y deben mantenerse durante 4-6 semanas antes de ser interpretados como negativos. (13)

4.3. Caldo Trypticasa de Soya (CTS)

El caldo tripticasa de soya es un medio líquido enriquecido no selectivo de uso general, el cual debe de estar en un rango de pH de $7,3 \pm 0,2$ (25°C) y presenta la siguiente composición:

Digerido Pancreático de Caseína	17,0 g
---------------------------------	--------

Digerido Papaínico de Soya	3,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Fosfato Dibásico de Potasio	2,5 g
Glucosa Monohidrato	2,5 g
Agua Purificada	1000 mL

Como se mencionó con el ATS, los primeros dos ingredientes son la fuente de nutrientes por el aporte de proteínas, NaCl permite el balance osmótico, K_2HPO_4 funciona como amortiguador y la glucosa es la fuente energética. Este medio permite el crecimiento de microorganismos de muchos tipos como por ejemplo *Aspergillus*, *Bacillus*, *Bacterioides*, *Candida*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Cuando hay crecimiento de microorganismos se produce una turbidez evidente. (14)

Este medio fue desarrollado originalmente para determinar la eficacia de las sulfonamidas contra los neumococos. Los clostridios y anaerobios no esporulantes crecen exuberantemente en este caldo cuando se incuban en condiciones anaerobias. (14)

En el LNCM se utilizan medios deshidratados con la mezcla preparada, por lo que se siguen los procedimientos establecidos según el fabricante para la elaboración de estos.

5. Factores que afectan a los medios de cultivo

Cuando se trata de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos, la forma de preparación de los medios de cultivo no es el único factor de variación entre lotes de medios de cultivo. También puede verse afectado la cantidad preparada, el tiempo que lleva almacenado después de la preparación y las condiciones de almacenamiento ya que la temperatura puede modificar inclusive la apariencia y el pH de los medios de cultivo. (15)

Debido a la variabilidad de los factores que afectan la calidad de los medios de cultivo, es necesario conocer los factores básicos que afectan las cualidades de los medios y por ende el crecimiento de microorganismos.

5.1. Composición de los medios

Todos los medios de cultivos, tanto para el crecimiento de bacterias o para hongos y levaduras, deben contener los siguientes componentes como regla general (8,16):

- Agua
- Carbono
- Energía
- Nitrógeno
- Azufre
- Fósforo
- Minerales
- pH
- Factores de crecimiento

Cuando los medios contienen sustancias biológicas -como infusiones de sangre, extractos de carne o de levadura, entre otros- provoca que los factores nutritivos lábiles se degraden con mayor facilidad y son más termosensibles a la temperatura, humedad y condiciones variadas. Sin embargo, actualmente se formulan muchos medios con peptona, la cual representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón.

5.2. Presencia o ausencia de oxígeno.

Las bacterias usualmente pueden promoverse en una atmósfera con oxígeno normal, algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos desde los componentes, empero hay ciertos microorganismos anaerobios estrictos que deben adecuarse a una atmósfera sin oxígeno ambiental para que se reproduzcan. Los microorganismos facultativos podrían crecer en ambas condiciones de presencia o ausencia de oxígeno. (16)

La prueba de recuento microbiano usualmente es adaptable a los microorganismos aerobios; sin embargo, si se examinan microorganismos anaerobios estrictos, se debe adecuar el sistema y calificarse para realizar la prueba.

5.3. Humedad relativa ambiental

Una humedad relativa (HR) en la atmósfera controlada y adecuada es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Cuando los medios de cultivo se encuentran almacenados en un lugar con un % de HR muy baja, tienden a desecarse y la promoción de microorganismos suele disminuir. (16)

5.4. Luz ambiental

Los medios de cultivo deben protegerse de la luz, debido a que puede afectar los nutrientes del agar, de hecho, se ha demostrado que la exposición previa a la luz solar en un laboratorio excepcionalmente iluminado inhibe el crecimiento de algunas especies de estafilococos y especies de *Proteus*. (17) En general, los microorganismos prefieren la oscuridad para el crecimiento, a excepción de los fotosintéticos. (16)

5.5. Acidez del medio

Los microorganismos se pueden clasificar según la acidez favorable de crecimiento, por eso es necesario controlar el pH del medio de cultivo para el óptimo desarrollo de las bacterias, hongos o levaduras. Algunas poblaciones bacterianas se favorecen en medios alcalinos y la mayoría crecen en medios neutros. En un pH inferior a 5, la actividad metabólica de bacterias disminuye, mientras que los hongos se propician la actividad en un rango de pH entre 5 y 6, como los dermatofitos que crecen en el medio Sabouraud dentro de ese rango de pH. (13,16,18)

5.6. Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros más críticos para el crecimiento de microorganismos y de hecho según la temperatura óptima de crecimiento, los microorganismos se pueden clasificar en (16,19):

- Psicrófilos obligados: Crecimiento entre 15 a 18°C. Por ejemplo, los de la clase *Flavobacterium*.

- Psicrófilos facultativos: Crecimiento entre 20 a 30°C, puede llegar hasta 35°C. Por ejemplo, los microorganismos encargados en la descomposición de alimentos guardados en refrigeración.
- Mesófilos: Crecimiento entre 35 a 47°C, la mayoría son *Eubacterias*.
- Termófilos: Crecimiento entre 50 a 75°C, algunos pueden llegar a 113°C (Hipertermófilos o termófilos extremos).

Por otro lado, las temperaturas altas pueden afectar la estabilidad del medio generando descomposición de algunos nutrientes y las temperaturas bajas (por debajo de 0°C) pueden congelar y dañar la estructura del gel. (20)

6. Esterilización de los Medios de Cultivo

El proceso de esterilización se refiere a la destrucción total de microorganismos, incluyendo las esporas bacterianas; este proceso puede realizarse mediante dos métodos: calor húmedo o por filtración. Los medios de cultivo deben esterilizarse el mismo día de la preparación. Algunos medios de cultivo no requieren de autoclavar, por lo que deben usarse después de hervir. (21).

6.1. Esterilización por calor húmedo

La esterilización por medio de autoclave permite llenar de vapor a una presión superior a la atmosférica y así lograr una temperatura por encima del punto de ebullición del agua para alcanzar las temperaturas de esterilización (121°C) (22)

Las ventajas de este método es que no dejan residuos, las autoclaves modernas son sencillas y relativamente rápidas para esterilizar. Éste es el método de elección para esterilizar materiales termoestables y no sensibles a la humedad como algunos medios de cultivo, cultivos de microorganismos para descartar, uniformes, instrumentos quirúrgicos, etc. (23)

La esterilización por calor debe evaluarse utilizando los valores F_0 , teniendo en cuenta el tratamiento térmico durante el calentamiento y enfriamiento. El tratamiento térmico debe definirse para la carga particular que se va a tratar para

garantizar un tratamiento adecuado para los recipientes, independientemente de la colocación en la autoclave. (21)

6.2. Esterilización por filtración

Este método permite esterilizar aquellos medios con componentes termolábiles, ya que los filtros utilizados tienen un tamaño de poro menor que el tamaño usual de microorganismos, por lo que estos quedan atrapados en la membrana por adsorción y filtración, dejando la solución libre de microorganismos viables, aunque esto último nunca es certero debido a que los virus pueden tener tamaños de incluso una proteína o un ADN, por lo que este método nunca es totalmente seguro. (22)

La esterilización por filtración se puede realizar en condiciones de vacío o presurizadas. Se recomienda utilizar equipos y membranas estériles con un diámetro de poro de 0,2 μm , pero se debe tomar en cuenta que algunas membranas de filtro pueden retener proteínas u otras sustancias (como antibióticos), por lo que debe considerar estos aspectos y cambiar el tipo de membranas como las de baja unión a proteínas. (21)

Cepas Microbiológicas

Cuando se trata de análisis bioanalíticos, es inherente conocer conceptos básicos acerca de cepas microbiológicas.

Las cepas microbiológicas son microorganismos claramente definidos por lo menos a nivel de género y especie, depositados y mantenidos en una Colección de Cultivos de Referencia e identificados con un número identificativo. Esta definición está aunada a las “Cepas de referencia”, pero a partir de esta se pueden obtener cepas idénticas mediante un único subcultivo, siendo “Cepas de Reserva”. Ahora bien, con las cepas de reserva se puede realizar otro subcultivo y a esta se le llamaría “Cepas de Trabajo”. (24)

Al manejar cepas microbiológicas, es necesario conocer acerca del término ATCC o la *American Type Culture Collection*, lo cual es una organización privada y sin fines de lucro dedicada a la adquisición, preservación, autenticación y distribución (en conjunto se utiliza el término de 'actividades APAD') de diversos materiales biológicos. Esta compañía se inicia a partir de 1925 distribuyendo cultivos de microorganismos y posteriormente los virus, animales, plantas y materiales de ADN recombinante se adicionan a la colección. ATCC proporciona la preservación permanente y la disponibilidad de estos materiales estandarizados para el uso de personas calificadas dedicadas a la ciencia, la industria y la educación. (25)

La empresa *Microbiologics*® es un proveedor líder de microorganismos listos para usar para las pruebas microbiológicas de control de calidad en las industrias clínica, farmacéutica, alimentaria, del agua y educativa. Estas cepas se fabrican de acuerdo con los estándares más altos de la industria, certificados o acreditados por las normativas internacionales (ISO 13484, ISO 17025 e ISO Guide 34) utilizando a su vez las cepas estandarizadas de ATCC. En el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos se toma en cuenta estos factores para la compra de cepas microbiológicas de altos estándares y estos se utilizan para las pruebas dentro de la Unidad Operativa. (26)

Las cepas de marca *Microbiologics*® *EZ-CFU OneStep*™ específicamente, son preparaciones de microorganismos liofilizados y contabilizados para mayor simplicidad en los laboratorios de análisis de calidad, tal como la marca lo menciona "a un solo paso" de obtener una cantidad específica de microorganismos. Todo esto con el fin de disminuir el manejo usual de microorganismos, la exposición de estos al ambiente, así como la facilidad de obtener entre 10 y 100 UFC (unidades formadoras de colonias) usualmente establecido en los métodos oficiales farmacopeicos. Además, para inocular los medios de cultivos en las pruebas de promoción de crecimiento u otros ensayos microbiológicos (27).

Para facilitar el conteo de bacterias, levaduras y hongos en las placas, se recomienda agregar de 10 - 100 UFC (7). Por ende, es necesario tener un método estandarizado para la recuperación de microorganismos viables específicos, el LNCM utiliza cepas

EZ·CFU OneStep™ los cuales están estandarizados para un manejo más sencillo de los microorganismos.

Para estandarizar un medio de cultivo es necesario una amplia gamma de organismos puestas a prueba para cubrir el rango de organismos buscados. Debido a que la intención del recuento microbiano de productos no estériles es buscar la mayoría de los microorganismos comunes de contaminación en el proceso de fabricación y que pueden infectar el cuerpo humano o animal por el uso del medicamento, por ende, se deben examinar los siguientes microorganismos según los métodos oficiales (7,21):

1. *Staphylococcus aureus spp. aureus* ATCC 6538 (28)

Este microorganismo es utilizado para testear medios, prueba de esterilidad, en el ensayo de desinfectantes o preservantes antimicrobianos y otros usos de carácter de investigación.

Su propagación se realiza en el Medio 18: Caldo o Agar Trypticase de Soya, a 37°C en una atmósfera aeróbica. Se pueden observar dos tipos de colonias al cultivar ATCC® 6538™ en placas de agar con sangre:

- La colonia tipo 1: amarilla, circular, entera, poco convexa y β-hemolítica
- La colonia tipo 2: blanca, circular, completa, convexa y β-hemolítica.

Aunque en el medio de mantenimiento Agar Trypticase de Soya, solo se ha observado la colonia tipo 1.

2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (29)

Este microorganismo es utilizado para testear medios, en el ensayo de preservantes antimicrobianos, en pruebas de eficacia y en el control de pruebas preparatorias. También para las pruebas de esterilidad.

Su propagación se realiza en el Medio 3: Agar o Caldo Nutriente, a 37°C en una atmósfera aeróbica. Se puede notar que producen pigmentos tanto de fluoresceína como de pirocianina y también produce un surfactante ramnolípido.

3. *Bacillus subtilis spp. spizizenii* ATCC 6633 (30)

Este microorganismo es utilizado para las pruebas de esterilidad y para el ensayo de rifampicina y otros antibióticos, así como para la prueba de susceptibilidad en disco de rifampicina.

Su propagación se realiza en el Medio 44: Agar o Caldo Infusión Cerebro-Corazón, a 30°C en condiciones aeróbicas. Esta produce subtilina, he allí su nombre *subtilis*.

4. *Candida albicans* Serotipo A ATCC 10231 (31)

Este microorganismo es utilizado para las pruebas de esterilidad generalmente. Esta cepa fue originalmente aislada desde un hombre con broncomicosis.

Su propagación se realiza bajo una temperatura entre 24 y 26°C en condiciones típicas aerobias en los siguientes medios:

- Medio 200: Agar o Caldo YM.
- Medio 28: modificación de Emmons del agar de Sabouraud.
- Medio YEPD.

En agar YEPD después de 2 días a 25 ° C, las colonias son de color crema, brillantes y lisas. Las colonias más antiguas muestran una estructura similar a filamentos en el margen y pueden tener surcos o carpetas. Las células son ovoides (3.06.0 x 4.08.0 µm), brotan, en su mayoría de forma individual y rara vez se agrupan en la cultura joven. Las células se alargarán y formarán pseudohifas ramificadas en forma de cadena en cultivos más antiguos.

5. *Aspergillus brasiliensis* o *Aspergillus niger* ATCC 16404 (32)

Esta cepa fue originalmente aislada desde la fruta de los arándanos de Carolina del Norte en Estados Unidos.

Su propagación se realiza bajo una temperatura entre 20 y 25°C en condiciones típicas aerobias en los siguientes medios:

- Medio 336: Agar Dextrosa de Papa.
- Medio 325: Agar extracto de malta.
- Medio 28: modificación de Emmons del agar de Sabouraud.

En cuanto a su morfología, son colonias inicialmente blancas o amarillentas, el micelio crece rápidamente y produce una capa densa de conidióforos erectos lisos, terminados por vesículas globosas que producen cadenas secas de conidias. Luego se convierte pálido a grisáceo o amarillo verdoso. Las vesículas se irradian, inicialmente pálidas, volviéndose de color marrón oscuro a negro. Conidios esféricos, de marca media marrón, muy rugosos, con crestas y protuberancias romas o puntiagudas. La esporulación puede inhibirse cuando se cultiva en recipientes con intercambio reducido de gases. Las colonias pueden exhibir sectorización con áreas de diferentes niveles de esporulación. El uso de esporas recién producidas como inóculo debería reducir la sectorización.

Validación del Procedimiento de Preparación de los Medios de Cultivo

El concepto de validación se ha expandido a lo largo de los años para abarcar una amplia gama de actividades y este se basa en la acción de probar la efectividad de métodos analíticos utilizados para el control de calidad de sustancias y productos farmacéuticos, procesos de manufactura, sistemas computarizados para ensayos clínicos, etiquetado o control de procesos, entre otros. (33)

Al hablar de la validación de un procedimiento de preparación de medios de cultivo es necesario considerar que los objetivos de validar un proceso determinado incluyen garantizar que (34):

- El diseño del proceso se evalúa para mostrar que el proceso es reproducible, fiable y robusto.
- El proceso de fabricación es definido, monitoreado y controlado.
- El aseguramiento se obtiene de forma continua para mostrar que el proceso permanece en un estado de control.

Existen varios enfoques para la validación de procesos, que incluyen: (34)

- Validación de procesos tradicional, que consiste en una validación prospectiva y concurrente.

- Diseño del proceso seguido por la calificación del proceso y la verificación continua del proceso.
- Una combinación de la validación de procesos tradicionales.

Los fabricantes de los medios deshidratados y los métodos oficiales usualmente no proporcionan procedimientos estandarizados y detallados para la elaboración de medios de cultivo ya que independientemente de cómo se prepare el medio, es esencial que funcione correctamente para garantizar que el ensayo que requiere el medio produzca resultados precisos, y la garantía de los medios de cultivo preparados lo establece cada laboratorio fabricante de medios a partir de medios deshidratados mediante una validación del procedimiento (35).

En la norma ISO 11134:2014 *Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua - Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo* establece que la preparación precisa y validada de los medios de cultivo es uno de los pasos fundamentales para garantizar la integridad del examen microbiológico y se le debe prestar especial atención. (21)

La validación de los medios de cultivo debe estar claramente definido y documentado mediante una recolección de datos que demuestren la reproducibilidad de las propiedades específicas de los medios. Esto se realiza mediante la recuperación del crecimiento de microorganismos específicos según el medio de cultivo y este representa la prueba para evaluar la calidad del medio de cultivo. (7,36)

Estudios de Estabilidad de los Medios de Cultivo

Según el RTCA 11.01.04:10, la estabilidad se refiere a la capacidad que tiene un producto de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad establecidas, mientras que un estudio de estabilidad son las *pruebas que se efectúan para obtener información sobre las condiciones en las que se deben procesar y almacenar las materias primas o los productos semielaborados o los productos terminados*. Además, estas pruebas se utilizan para determinar un período de validez del medicamento en su envase primario original y en condiciones de almacenamiento especificadas. (37)

Por otro lado, el período de validez se refiere al intervalo de tiempo en que se espera que el medio de cultivo, después de su producción, permanezca dentro de las especificaciones aprobadas y la fecha de vencimiento señala el final del período de eficacia de los medios de cultivo y a partir de la cual no deben utilizarse para sus pruebas, basándose en los estudios de estabilidad. (37)

Con base en lo anterior, se debe establecer las condiciones de almacenamiento para realizar estudios de estabilidad y la frecuencia de análisis. Algunas referencias señalan que algunos medios pueden almacenarse en frascos bien cerrados (no en placas) por un tiempo de hasta 6 meses de validez (16,21), pero puede variar de un medio a otro, por lo que los laboratorios fabricantes deben establecer las fechas de vencimiento para cada uno de sus medios mediante estudios de estabilidad de los medios de cultivo.

En cuanto a los análisis correspondientes inherentes en el estudio de estabilidad de los medios de cultivo se hallan:

- Atributos visuales de calidad, como cambios de color o deshidratación o signos de deshidratación.
- Acidez del medio.
- Promoción de medios de cultivo de microorganismos específicos para cada medio de cultivo.

Prueba de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles

La prueba de recuento microbiano es una prueba bioanalítica para muestras no estrictamente estériles en la cual se realiza una estimación cuantitativa del número de bacterias mesófilas y hongos en condiciones aerobias presentes en los productos a examinar (7).

El examen microbiológico de productos no estériles para los capítulos generales de los libros oficiales farmacopeicos, están armonizados de acuerdo con el anexo tripartito finalizado en el trámite 4 en noviembre de 2008, resultado del proceso Q4B; es decir, un Grupo de trabajo de expertos de ICH (por sus siglas en inglés *International*

Council of Harmonization) (38) compuesto por reguladores y representantes de la industria de las tres regiones de ICH más algunos observadores, siendo como principal objetivo armonizar los textos de las farmacopeas Ph. Eur. (Farmacopea Europea), USP (Farmacopea de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés United States Pharmacopoeia) y JP (Farmacopea Japonesa), para que se puedan usar como intercambiables. (38)

Después de esa fecha, las farmacopeas realizan modificaciones de sus procedimientos y entre los cambios se sitúan en que los libros anteriores al año 2008 se encuentra la mezcla Caldo Tripticasa de Soya con Lecitina y Polisorbato 20 como medio general al que se le adiciona los agentes neutralizantes para la realización de las pruebas de recuento microbiano. Ya para las versiones posteriores al 2009, se elimina esta combinación y se deja sin agentes neutralizantes a menos que el producto lo requiera, empero se presenta el polisorbato 80 como un agente al que se adiciona a los buffer o medios no selectivos, también se recomienda utilizar tween 80 para examinar productos no grasos insolubles en agua, productos grasos y parches transdérmicos. (39,40)

1. Tipos de Análisis bioanalíticos

Dependiendo de la vía de administración y de la forma farmacéutica de los medicamentos, los productos farmacéuticos pueden requerir una ausencia completa de partículas viables y no viables o un límite especificado de microorganismos mesófilos. Según el capítulo <1151> de la USP, se establecen las principales rutas de administración, así como los requisitos de calidad higiénica de los medicamentos:

Tabla 2. Análisis de calidad higiénica según las principales rutas de administración para las formas farmacéuticas de dosificación. (41-43)

Ruta de administración	Pruebas higiénicas de calidad
Parenterales	Esterilidad y Endotoxinas.

Oftálmicos	Esterilidad
Oral	Recuento Microbiano. Microorganismos Específicos: <i>Escherichia. coli</i>
Rectal	Recuento Microbiano.
Uso en oromucosas Uso gingival	Recuento Microbiano. Microorganismos específicos: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tópico Transdérmico Óticos Nasal	Recuento Microbiano. Microorganismos Específicos: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Inhalatorio	Recuento Microbiano. Microorganismos Específicos: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Bacterias gram negativas tolerantes a la Bilis
Vaginal	Recuento Microbiano. Microorganismos Específicos: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Candida albicans</i>

Basado en el cuadro anterior, se detallan algunas pruebas a continuación:

1.1. Prueba de Esterilidad

Esta prueba asegura que la muestra está totalmente libre de microorganismos viables. Cuando un medicamento no se encuentra estéril, genera efectos sistémicos inmediatos que podrían causar la muerte del paciente. Cuando los microorganismos llegan al torrente sanguínea, puede provocar un shock séptico

debido a que éstos al estar dentro del individuo (a 37°C) les favorecen el crecimiento y por ende generar infección invasiva. (44)

1.2. Prueba de Límite de Endotoxinas

Esta prueba asegura que la cantidad de endotoxinas o pirógenos no supere el límite de UE (Unidades de Endotoxinas) en cierta cantidad de muestra. Las endotoxinas se tratan de una construcción de moléculas de lipopolisacáridos que provienen de la membrana de microorganismos “muertos”. Estas generalmente son parte de la membrana externa de las bacterias gram negativas. (45)

1.3. Prueba de Recuento Microbiano

Esta prueba asegura que el producto no supere un límite de microorganismos especificados en las monografías oficiales para cada medicamento, se pretende que no supere el límite superior por debajo del cual la exposición a un peligro no constituye un riesgo. (46) Cuando se trata de un medicamento no inyectable, los seres vivos tienen más barreras naturales que defienden al cuerpo de los microorganismos patógenos incluyendo el microbiota intestinal o de la piel, por lo que el individuo puede tolerar ciertos límites de los microorganismos (47). Por lo tanto, cuando tal producto supera los límites aceptables generan efectos adversos intolerables o que pueden empeorar la patología y complicarse en infecciones difíciles de tratar.

1.4. Prueba de Microorganismos Específicos

Esta prueba asegura que el producto no posea microorganismos específicos patógenos para la vía a la cual va dirigida. Un microorganismo puede ser parte de la flora normal en una parte del cuerpo, mas puede convertirse en patógeno una vez se exagera o pasa a otro órgano en la cual no puede tolerar y genera algunas infecciones comunes. Por ejemplo, el género *Staphylococcus sp.* es común en la piel; sin embargo, cuando se exagera puede generar acné o infecciones difíciles de controlar. (48)

2. Métodos de Conteo Microbiano

Como se observa en la Tabla 2, todos los productos no estériles requieren de la prueba de recuento microbiano, por ende, es importante conocer los tres principales métodos del conteo de microorganismos, de acuerdo con los libros oficiales (7):

2.1. Filtración de membrana

En este método se realiza el conteo por medio de la retención de microorganismos en una membrana con tamaño de poro menor a $0,45\ \mu\text{m}$ y el filtro posteriormente es transferido a una placa de medio de cultivo sólido para el crecimiento de los microorganismos viables. Una de las desventajas de esta metodología es que la filtración por membrana puede presentar el problema de crecimiento de los microorganismos atrapados en los poros, resultando una cierta inhibición por contacto (7,49). Esta técnica es aplicada a la examinación del agua purificada dentro del laboratorio.

2.2. Método de Conteo en Placa

El conteo en placa consiste en contar los microorganismos que se agregan directamente a la placa de medio de cultivo sólido (sea antes o después de solidificar el medio). Este método proporciona resultados más reproducibles que la técnica de filtración por membrana y es utilizado por LNCM para el recuento de productos farmacéuticos. (7,49)

2.3. Método por el Número Más Probable

En este se realiza el conteo de tubos “Positivos” de diferentes concentraciones de microorganismos y se determina el número más probable de microorganismos (UFC/g o UFC/mL) tomando una tabla militar preestablecida. Este método, definitivamente, tiene una precisión y exactitud menor que los métodos de filtración por membrana y recuento en placa, además, sólo se reserva para el crecimiento de microorganismos aerobios en situaciones donde no hay otro método disponible, por lo que dentro del laboratorio no se utiliza este método. (7)

3. Métodos de Recuento en Placa

El método de recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria, hongo o levadura se reproduce para generar una colonia, aunque con frecuencia crecen en cadenas o grumos, en ramificaciones, filamentos o micelios. Por lo tanto, una colonia crece debido a segmentos cortos en cadena o de un agregado en grupo. Por esa razón, es posible detectar -dentro del espectro visible- cuando hay suficiente crecimiento en una colonia y se le reconoce como unidades formadoras de colonias (UFC). El crecimiento de UFC debe mantenerse en un área suficientemente aislada de otra UFC, es necesario controlar el número de cepas agregadas dentro de una placa, para que estas puedan ser contadas; de lo contrario, sería un factor de inexactitud en el recuento. (50)

El recuento en placa se puede realizar de dos maneras, por método de extensión en superficie y método de vertido en placa:

3.1. Extensión en superficie

Es un método en el cual cada célula viable puede formar una colonia en placa con agar adecuado para el crecimiento de microorganismos, donde se extiende un volumen no mayor de 0,1 mL de la muestra sobre la superficie de un medio de cultivo sólido utilizando un asa estéril o un escobillón de vidrio. Tales placas se incuban por un tiempo y temperatura determinada para posteriormente realizar el conteo de las colonias. (51)

3.2. Vertido en placa

En este método, cada célula viable es capaz de replicarse y formar una colonia sobre un medio sólido, en la cual se agrega en una placa vacía un volumen no mayor a 1 mL de muestra y posteriormente se mezcla con un volumen de 15-20 mL de medio de cultivo sólido. Después de solidificar, se incuba bajo un tiempo y temperatura específicos y luego se cuentan las colonias visibles en la placa. (51)

Aptitud del Método de Recuento Microbiano

Para asegurar que la prueba de límite microbiano es adecuada y viable para poder examinar la muestra, se debe realizar la Aptitud del método de recuento, esto con el fin de eliminar la posibilidad de “falsos negativos” debido a la inhibición del crecimiento de los microorganismos de la muestra durante el proceso de recuento.

Una razón de la realización de esta prueba es debido a que, ante la presencia de antimicrobianos, sean preservantes, desinfectantes o cualquier otra sustancia dentro del producto a examinar puede verse afectado el crecimiento de microorganismos, viéndose como resultado de la prueba de recuento microbiano como una “ausencia” de microorganismos o el poco crecimiento de microorganismos, por lo que puede ocultar verdaderamente la prueba como tal dando un resultado “falso negativo”. (7)

Un producto podría tener microorganismos fuera de especificaciones, pero por la utilización de los antimicrobianos en los productos, se logran “ocultar” la contaminación que conlleva la muestra. Por ende, se realiza esta prueba para verificar que el método de recuento, ante la presencia del producto a examinar (junto con todos sus preservantes y antimicrobianos) logra crecer la cantidad agregada -usualmente menor de 100 UFC- de microorganismos preestablecidos. (7)

Cuando el producto presenta actividad antimicrobiana es necesario modificar el método de prueba de acuerdo con la Tabla 3 de agentes neutralizantes o métodos para sustancias de interferencias (7):

Tabla 3. Agentes neutralizantes o métodos para sustancias de interferencias. (7)

Sustancia de Interferencia	Agente Neutralizantes Potenciales/ Método
Glutaldehído, mercuriales	Sulfito ácido de sodio (Bisulfito de sodio)
Fenólicos, alcohol, aldehídos, sorbato	Dilución
Aldehídos	Glicina

Compuestos de amonio cuaternario (CAC), parahidroxibenzoatos (parabenos), bis-biguanidas	Lecitina
CAC, yodo, parabenos	Polisorbato
Mercuriales	Tioglicolato
Mercuriales, halógenos, aldehídos	Tiosulfato
EDTA (edetato)	Iones de Mg o Ca

Si la actividad antimicrobiana del producto con respecto a alguno de los microorganismos de la prueba no puede neutralizarse, se puede asumir que el producto no puede contaminarse con el tipo de microorganismo que inhibe. (52)

Otra de las razones por las cuales se debe comprobar si el método es apto se debe al hecho de que, ante diferentes formas farmacéuticas, el medio de cultivo puede entrar en obstáculos de solubilidad por tener barreras hidrofílicos-lipofílicos. Esto sucede, por ejemplo, en las emulsiones (cremas, ungüentos) en las que se tiene una emulsión de tipo W/O (acuoleosa) y los medios puestos en contacto son acuosos, por lo que el medio no entra en contacto con el principio activo y podría darse un resultado “falso negativo” debido a que el medio de cultivo nunca entró en contacto con la muestra. Por lo tanto, al medio de cultivo se agregan agentes emulsificantes o agentes neutralizantes de los antimicrobianos según la naturaleza del producto o según los antimicrobianos presentes. (7)

RECURSOS

Todos los recursos son proporcionados por el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos de la Caja Costarricense de Seguro Social.

1. Equipos

- Cámara de Flujo Laminar.
- Una incubadora capaz de mantener una temperatura entre 30-35°C.
- Una incubadora capaz de mantener una temperatura entre 20-25°C.
- Una autoclave para esterilizar los medios (Figura 2).
- Dispensador de medios, con tubo de material de poliestireno adaptables al dispensador.
- Balanza Analítica.
- Balanza Granataria.
- Vórtex.
- Plantilla magnética.
- Máquina etiquetadora.
- Micropipeta de 1000 µL y puntas estériles de 1000 µL.
- Micropipeta de 100 µL y puntas estériles de 100 µL.
- pH-metro con electrodo plano capaz de medir medios sólidos y líquidos (Figura 1)



Figura 1. pH-metro Metrohm 780.¹



Figura 2. Equipo de esterilización (Autoclave).²

1 https://www.metrohm.com/es/productos/medicion-de-ph-iones/780_781-ph_ion-meters/27800010

2 <https://www.getinge.com/int/product-catalog/getinge-hs33/>

2. Materiales

- Aproximadamente 660 Placas de Petri de plástico estériles.
- 150 frascos autoclavables de 200 mL para contener los Medios de Cultivo sólidos.
- 400 frascos ámbar autoclavables de 100 mL para contener los medios líquidos.
- Recipientes metálicos de aluminio para la preparación de Medios de Cultivo.
- Jeringas de 10 mL.
- Probetas calibradas para verter TD (Clase A).
- Beakers de gran volumen (1000-3000 mL)
- Tubos de vidrio con tapa.
- Espátula o cuchara para pesar los medios deshidratados.
- Pastilla magnética.
- Pinzas estériles.
- Asas estériles desechables.
- Hojas de indicador químico de Bowie-Dick.
- Guantes termorresistentes.
- Mantillas estériles.
- Mantillas limpias.
- Etiquetas adheribles.
- Papel Toalla.

3. Reactivos

- Medio de cultivo deshidratado Agar Trypticase de Soya.
- Medio de cultivo deshidratado Agar Sabouraud Dextrosa.
- Medio de cultivo deshidratado Caldo Trypticase de Soya.
- Polisorbato 80.
- Solución Buffer pH 4,0 para calibrar el pH-metro.

- Solución Buffer pH 7,0 para calibrar el pH-metro.
- Solución Buffer pH 10,0 para calibrar el pH-metro.
- Solución NaOH 0,1 mL para ajustar pH.
- Agua purificada o Agua desionizada.
- Solución Salina 0,9 % estéril.
- Fluidos de rehidratación Microbiologics® para hidratar las cepas microbiológicas.
- Alcohol Isopropílico 70%.

4. Cepas microbiológicas

- 20 pellets *Staphylococcus aureus* EZ·CFU OneStep™
- 20 pellets *Pseudomonas aeruginosa* EZ·CFU OneStep™
- 20 pellets *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii* EZ·CFU OneStep™
- 20 pellets *Candida albicans* EZ·CFU OneStep™
- 20 pellets *Aspergillus brasiliensis* EZ·CFU OneStep™

METODOLOGÍA

Identificación de las mejores prácticas y recomendaciones internacionales para la fabricación de medios de cultivo

Se realizará una revisión bibliográfica tomando en cuenta las farmacopeas vigentes normativas internacionales y otras referencias bibliográficas con el fin de identificar las principales recomendaciones y buenas prácticas de fabricación de medios de cultivo para definir una metodología estándar de preparación a ejecutar en el LNCM.

Validación del Procedimiento de Preparación de Medios de Cultivo

Una vez definida la metodología de preparación de medios de cultivo, se validará la fabricación de los medios de cultivo Caldo Tripticasa Soya, Agar Tripticasa Soya y Agar Sabouraud Dextrosa.

Para ello se diseñó un protocolo de validación de la fabricación de los medios, a ejecutar 3 lotes de fabricación para cada uno de los medios mencionados anteriormente a partir de medios de cultivo deshidratados del mismo fabricante.

Se evaluarán los parámetros críticos del proceso de fabricación y se retaron los atributos críticos de calidad según las especificaciones preestablecidas para cada medio, incluyendo pruebas organolépticas, prueba de pH y prueba de promoción del medio.

Estudio de Estabilidad de los Medios de Cultivo

Para evaluar la estabilidad de los medios de cultivo preparados para establecer un período de validez bajo condiciones de almacenamiento ambientales y de refrigeración, se debe repetir los análisis sobre los atributos de calidad establecidos para evaluar los medios de cultivo para garantizar que los medios mantienen las condiciones y atributos de calidad aceptables (descritos en el Anexo correspondiente a la validación de los medios de cultivo).

Se realizará el estudio de estabilidad a 3 lotes de Agar Tripticasa de Soya de 5 litros, 3 lotes de Agar Sabouraud Dextrosa de 5 litros, 2 lotes de Caldo Tripticasa de Soya de 9 litros y 1 lote de este último medio, pero de 20 litros.

Tabla 4. Cantidad de frascos almacenados en cada condición de almacenamiento.

Medio de Cultivo	Condiciones ambientales (TA) (15-25) °C	Condiciones de Refrigeración (Ref) (2-8) °C
ATS	10 frascos de 200 mL	10 frascos de 200 mL
ASD	5 frascos de 200 mL	5 frascos de 200 mL
CTS80	25 frascos de 90 mL	25 frascos de 90 mL

Nota: la cantidad establecida incluye unos medios en exceso en casos de que se tenga que realizar alguna repetición.

A partir de la división anterior, se establecen los códigos “TA” para aquellos medios almacenados en condiciones normales y “Ref” para aquellos almacenados en condiciones de refrigeración.

Los tiempos establecidos para cada prueba serán los siguientes:

- 0 días. Las pruebas para este tiempo se obtienen a partir de los datos obtenidos en la Validación de la Preparación de medios de Cultivo.
- 15 días.
- 30 días.
- 60 días.
- 90 días.

A los mismos 9 lotes de medios, se les realizan los siguientes atributos de calidad en cada uno de los tiempos anteriores (53):

- Inspección visual.
- pH.
- Promoción de Medios de Cultivo.

Actualización de la Prueba de Recuento Microbiano

Realizar una revisión bibliográfica de la Farmacopea de los Estados Unidos versión vigente (USP41) y realizar un procedimiento con la actualización metodológica.

Aplicar la metodología actualizada a cuatro productos no estériles de análisis rutinario en el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos que pertenezcan a cuatro formas farmacéuticas diferentes entre sí. Los medicamentos ya han sido analizados previamente y pertenecen a muestras de retención dentro del LNCM. Se consiguió 3 lotes diferentes de cada producto y se examinaron para este objetivo.

Verificación de la Aptitud del Método de Recuento Microbiano

Realizar la prueba de Aptitud del Recuento Microbiano a los cuatro productos escogidos para aplicar el método actualizado: crema de rosas, ungüento de ácido salicílico, jarabe de clorfenamina y polvo de colestiramina.

RESULTADOS

Identificación de las mejores prácticas y recomendaciones internacionales para la fabricación de medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo se tomó en cuenta las siguientes referencias bibliográficas

- El instructivo interno actual del laboratorio LNCM-IT-071-2 *Preparación de Medios de Cultivo*. (5)
- Recomendaciones de la farmacopea estadounidense versión USP41 en el capítulo <1117> *Óptimas Prácticas de Laboratorio Microbiológico*. (20)
- En la normativa internacional ISO 11134:2014 *Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua - Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo*. A pesar de ser una referencia para ingeniería de alimentos y de examinación de aguas, es muy aplicable a las metodologías de preparación de medios de cultivo utilizados en los análisis farmacéuticos. (21)
- Recomendaciones de los fabricantes de medios de cultivo deshidratados como Merck, Neogen o Acumedia, Difco.
- Recomendaciones de instituciones destacados en análisis microbiológicos y en el manejo de medios de cultivo como *Microbiology Network*. (54)
- Recomendaciones de autores de libros y manuales prácticos de microbiología, que igualmente son aplicables a los medios de cultivo usados con fin de análisis de productos farmacéuticos. (16)

A partir de lo anterior se crea la siguiente tabla de puntos que verificar, así como las referencias que recomiendan realizar la acción.

Tabla 5. Aspectos a verificar según diferentes fuentes bibliográficas.

Verificar lo siguiente:	Referencias
DOCUMENTACIÓN	
Nombre del medio, componentes individuales y cualquier suplemento y, si es posible, sus códigos de producto.	16,21,54
Hoja de datos técnicos: ej. formulación, uso previsto, cantidad de llenado (si corresponde), referencias	16,21
Datos de seguridad y/o riesgos	21
Número de lote	7,16,21,54
pH objetivo del medio preparado recomendado por fabricante.	7,16,21
Información de almacenamiento y fecha de caducidad	21
Vida útil asignada	21
Certificado de control de calidad que muestre los organismos de prueba utilizados y los resultados de las pruebas de rendimiento con criterios de aceptación	7,16,21
Recomendaciones del Fabricante en el CoA o en el MSDS.	16
MATERIA PRIMA	
Identificación del producto	21
Integridad de los envases	16,21
Fecha de caducidad del producto	5,7,16,21
Documentación suministrada	21
Número de unidades recibidas	21,54
Registrar la fecha de recepción	16,21,54
Lugar de Almacenamiento	54
CONTENEDORES ABIERTOS	
El cierre de integridad o sello.	7,21
Relleno desigual de envases.	7
Fecha de registro de la primera apertura	16,21,54
Evaluar visualmente el contenido de los contenedores abiertos.	7,16,21,54

(Características de flujo del producto, la homogeneidad, el apelmazamiento, oscurecimiento de color. Cualquier medio deshidratado que haya absorbido humedad o que muestre cambios evidentes en la apariencia física debe ser descartado).	
AGUA	
Uso de agua purificada, destilada, desmineralizada, desionizada o producida por ósmosis inversa	5,6,7,21,54
pH agua neutral entre 5.5 y 7.5	54
En recipientes herméticamente cerrados o usar tan pronto como se produzca el agua.	21
Contaminación microbiana no debe exceder las 103 UFC/mL. (Controlar regularmente con una incubación a 22 °C ± 1 °C durante 68 h ± 4 h)	21
Conductividad del agua no debe ser superior a 25 μScm^{-1} (o una resistividad $\geq 0,04 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) y preferiblemente inferior a 5 μScm^{-1} (agua de grado 3, según ISO 3696) a 25 ° C.	21
PREPARACIÓN	
Documentar: Código y número de lote, Masa/volumen, pH, Datos de preparación, Condiciones de esterilización, Operador.	5,7,21
No sobrecalentar los medios. Utilizar calentamiento, agitación y mezclado constante.	7,54
Agitar envase antes de pesar.	16
Rehidratar con volumen exacto de agua	16,21
Balanzas calibradas	7,16
Personal capacitado	7,53
Esterilizar por calor húmedo preferiblemente, a menos que el medio sea termolábil. Ciclos de autoclaves validados.	7
El pH debe medirse después de enfriar el medio hasta 20-25°C retirando asépticamente una muestra para el análisis. Los medios	7,54

refrigerados deben calentarse hasta la temperatura ambiental de trabajo. Usar pH-metro instalados con sondas planas para examinar pH de medios sólidos y una sonda de inmersión para líquidos.	
Evitar ajustes de pH excesivos	54
Medir el pH (Ver Metodología aparte) antes de su esterilización y ajustarlo en caso de ser necesario con NaOH o HCl (ambos 0.1 N)	16,54
Envases previamente lavados y limpios, sin residuos de detergentes.	5,16,54
Calibrar el dispensador automático de volumen.	16
Etiquetar cada envase: Lote, nombre o abreviatura, vencimiento.	16
ALMACENAMIENTO	
Almacenar entre 15-25°C.	5,16
Seguir analogía <i>First-in</i> y <i>First-out</i>	16,54
No almacenar bajo 0°C	7
Lugar seco protegidos de la humedad. Protegidos de la luz. Los envases deben estar siempre bien cerrados durante almacenamiento	16,54
Preincubar una muestra de los medios de cultivo o una porción de sus envases, a 30-35 °C, durante no menos de 3 días para asegurar la esterilidad.	5,16
ANTES DE USAR. POST-ALMACENAMIENTO	
Agares. Utilizar un baño maría de agua hirviendo o mediante un ciclo de autoclave de 15 minutos a 121°C. Evitar sobrecalentamiento. Retirar una vez derretido completamente.	21
Agares. Colocar en baño de agua termorregulado a 40-45°C, por no más de 4 horas para su utilización.	21
Colocar en baño de agua termorregulado por no más de 8 horas antes de la utilización	7

Agares. Fundir solo una vez.	5,21
Ausencia de: Signos de deshidratación, oscurecimiento de color, Formación de cristales por posible congelación, Excesiva cantidad de burbujas	7,54

Con respecto a la información anterior, se realizó el procedimiento estandarizado de preparación de medios aplicado al LNCM.

Validación del Procedimiento de Preparación de Medios de Cultivo

1. Ejecución de los lotes de medios de cultivo

Se siguió el procedimiento descrito en el ANEXO 1 de 'Procedimiento de Preparación de los Medios de Cultivo' y se anotaron los siguientes datos.

Tabla 6. Datos relevantes en la Preparación de los Medios de Cultivo

Medio de Cultivo	Peso (g)	Volumen preparado	Volumen envasado	pH*	Hervido	Auto-clavado	Apariencia
ATS-01	200.024	5 L	200 mL	7.31	☑	☑	Café-amarillento.
ATS-02	200.004	5 L	200 mL	7.37	☑	☑	
ATS-03	200.015	5 L	200 mL	7.20	☑	☑	
ASD-01	325.007	5 L	200 mL	5,45	☑	☑	Amarillo claro.
ASD-03	325.013	5 L	200 mL	5.30	☑	☑	
ASD-04	325.016	5 L	200 mL	5.40	☑	☑	
CTS80-01	270.001	9 L	90 mL	7.29	☒	☑	Amarillo-beige.
CTS80-02	270.015	9 L	90 mL	7.24	☒	☑	
CTS80-03	600.018	20 L	90 mL	7.37	☒	☑	

*Los pH corresponden a los valores después de esterilización.

2. Análisis de los medios de cultivo fabricados

Los resultados pertinentes a los análisis de los medios fabricados se detallan en las siguientes tablas:

2.1. Caldo Trypticase de Soya con Polisorbato 80.

Tabla 7. Resultados de análisis de los atributos de calidad del CTS80.

Análisis	Especificaciones de Calidad	Resultados CTS80-01	Resultados CTS80-02	Resultados CTS80-03
Antes de esterilización				
pH	7,3 ± 0,2	7.34	7.34	7.37
Inspección Visual	Amarillo-Beige. Ausencia de turbidez. Sin grumos.	Conforme	Conforme	Conforme
Después de esterilización				
pH	7,3 ± 0,2	7.29	7.24	7.37
Inspección Visual	Amarillo-Beige. Ausencia de turbidez.	Conforme	Conforme	Conforme
Promoción: <i>S. aureus</i>	Turbidez	Turbio	Turbio	Turbio
<i>P. aeruginosa</i>	Turbidez	Turbio	Turbio	Turbio
<i>B. subtilis</i>	Turbidez	Turbio	Turbio	Turbio
Control de contaminación	No Turbidez	Translúcido	Translúcido	Translúcido

2.2. Agar Trypticasa Soya

Tabla 8. Resultados de análisis de los atributos de calidad del ATS.

Análisis	Especificaciones de Calidad	Resultados ATS-01	Resultados ATS-02	Resultados ATS-03
Antes de esterilización				
pH	7,3 ± 0,2	7.31	7.33	7.25
Inspección Visual	Café-amarillento. Ausencia de turbidez después de hervir.	Conforme	Conforme	Conforme
Después de esterilización				
pH	7,3 ± 0,2	7.31	7.37	7.20
Inspección Visual	Café-amarillento y Ausencia de turbidez justo después de autoclavar. Café-amarillento no translúcido después de solidificar.	Conforme	Conforme	Conforme
Promoción:				
<i>S. aureus</i>	50% ≤ R ≤ 200%	76	98	79
<i>P. aeruginosa</i>	50% ≤ R ≤ 200%	45	40	55
<i>B. subtilis</i>	50% ≤ R ≤ 200%	103	174	108
<i>C. albicans</i>	50% ≤ R ≤ 200%	52	69	69
<i>A. niger</i>	50% ≤ R ≤ 200%	69	79	88
Control de contaminación	0 UFC	0	0	0

2.3. Agar Sabouraud Dextrosa

Tabla 9. Resultados de análisis de los atributos de calidad del ASD.

Análisis	Especificaciones de Calidad	Resultados ASD-01	Resultados ASD-02	Resultados ASD-03	Resultados ASD-04
Antes de esterilización					
pH	5,6 ± 0,2	5.71	5.71	5.63	5.70
Inspección Visual	Amarillo. Ausencia de turbidez después de hervir.	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Después de esterilización					
pH	5,6 ± 0,2	5.45	5.26	5.30	5.40
Inspección Visual	Amarillo y ausencia de turbidez justo después de autoclavar. Amarillo no translúcido después de solidificar	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Promoción: <i>C. albicans</i>	50% ≤ R ≤ 200%	96	NA	71	81
<i>A. niger</i>	50% ≤ R ≤ 200%	52	NA	55	76
Control de contaminación	0 UFC	0	0	0	0

3. Desviaciones de resultados fuera de especificación

Tabla 10. Resultados de análisis de los atributos de calidad del ASD en la promoción de crecimiento.

N° Desviación	Análisis fuera de rango	Descripción y justificación
1	Promoción <i>P. aeruginosa</i> fuera de rango para ATS-01 y ATS-02	El <i>P. aeruginosa</i> es gram-negativo de metabolismo oxidativo versátil, por lo que el método por vertido de placa disminuye el crecimiento. ³
2	pH fuera de rango para ASD-02 y ASD-03.	El ASD tiende a disminuir de pH drásticamente después de esterilización ya que este medio es más termosensible. Al realizar la prueba de Promoción, se encuentra conforme, por lo que no se descarta el medio.

³ Moya A, Joó L, Rodríguez A, Hernández J, Hernández J, Almenares J et al. Preparado de inmunoglobulina contra LPS de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11. *VacciMonitor* [Internet]. 2002 [cited 21 June 2019];11(1):11-17. Available from: <http://www.bvv.sld.cu/vaccimonitor/vm2002/a3.pdf>

Estudio de Estabilidad de los Medios de Cultivo

1. Inspección visual de los atributos de calidad

Tabla 11. Inspección Visual de Calidad a través del tiempo.

Medio de Cultivo	Especificaciones	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo
		0	15	30	60	90
CTS80-01-TA	No turbidez	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CTS80-01-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CTS80-02-TA		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CTS80-02-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CTS80-03-TA		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CTS80-03-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ATS-01-TA	Café-amarillento opalescente.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ATS-01-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ATS-02-TA		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ATS-02-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ATS-03-TA		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ATS-03-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ASD-01-TA	Amarillo opalescente	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ASD-01-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ASD-03-TA		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ASD-03-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ASD-04-TA		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ASD-04-Ref		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

2. Acidez del medio de cultivo

Tabla 12. Valores de pH y sus correspondientes temperaturas del Estudio de Estabilidad.

	Tiempo 0 días	T (°C)	Tiempo 15 días	T (°C)	Tiempo 30 días	T (°C)	Tiempo 60 días	T (°C)	Tiempo 90 días	T (°C)
CTS80-01-TA	7.29	26	7.17	27	7.22	23	7.14	25	7.15	20
CTS80-01-Ref			7.18	23	7.25	24	7.18	20	7.21	20
CTS80-02-TA	7.24	25	7.16	28	7.21	23	7.13	26	7.14	20
CTS80-02-Ref			7.20	25	7.16	28	7.23	24	7.20	20
CTS80-03-TA	7.37	27	7.18	28	7.23	23	7.15	26	7.16	19
CTS80-03-Ref			7.19	25	7.26	24	7.21	19	7.22	19
ATS-01-TA	7.31	26	7.40	26	7.30	33	7.39	24	7.26	26
ATS-01-Ref			7.27	26	7.31	32	7.30	19	7.36	19
ATS-02-TA	7.37	27	7.31	26	7.33	32	7.37	29	7.43	25
ATS-02-Ref			7.29	26	7.32	26	7.38	29	7.36	29
ATS-03-TA	7.20	26	7.20	26	7.20	24	7.14	29	7.15	26
ATS-03-Ref			7.18	26	7.23	26	7.19	29	7.16	21
ASD-01-TA	5.45	30	5.25	26	5.21	28	5.29	24	5.22	25
ASD-01-Ref			5.14	27	5.09	28	5.42	21	5.15	23
ASD-03-TA	5.31	26	5.30	26	5.31	25	5.17	29	5.32	24
ASD-03-Ref			5.22	26	5.20	27	5.49	27	5.25	29
ASD-04-TA	5.38	26	5.31	25	5.28	28	5.36	23	5.18	29
ASD-04-Ref			5.26	26	5.25	28	5.38	25	5.34	29

Nota: el código "TA" corresponde a almacenamiento en temperaturas normales, mientras que el término "Ref" corresponde a almacenado bajo refrigeración.

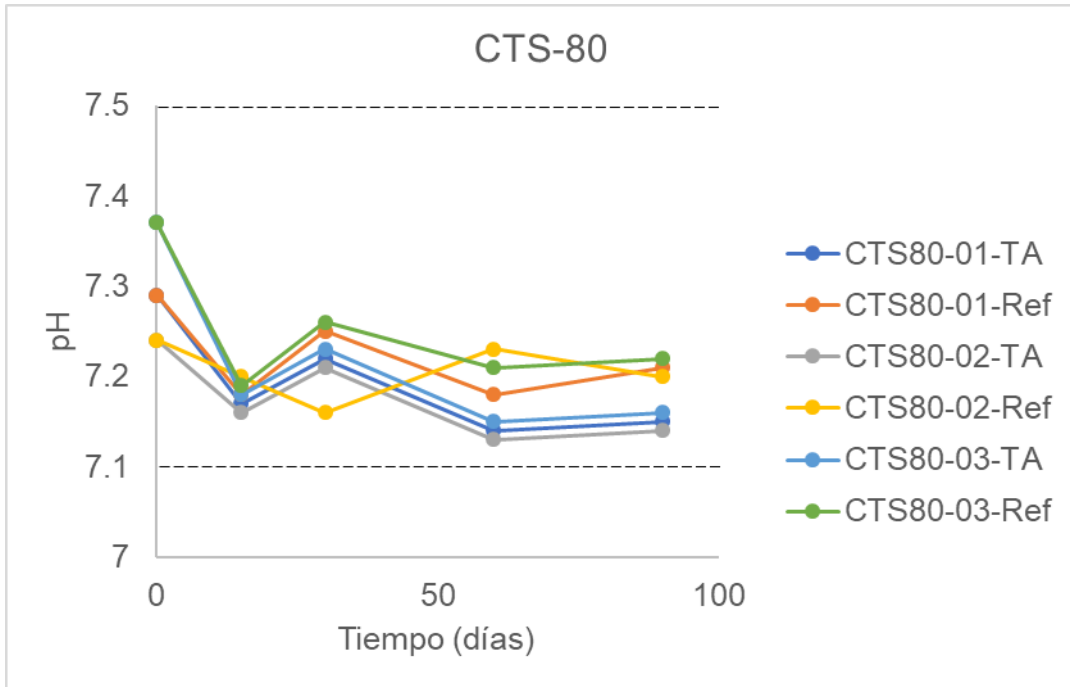


Figura 3. Medidas de pH de los lotes de Caldo Tripticasa de Soya fabricados.

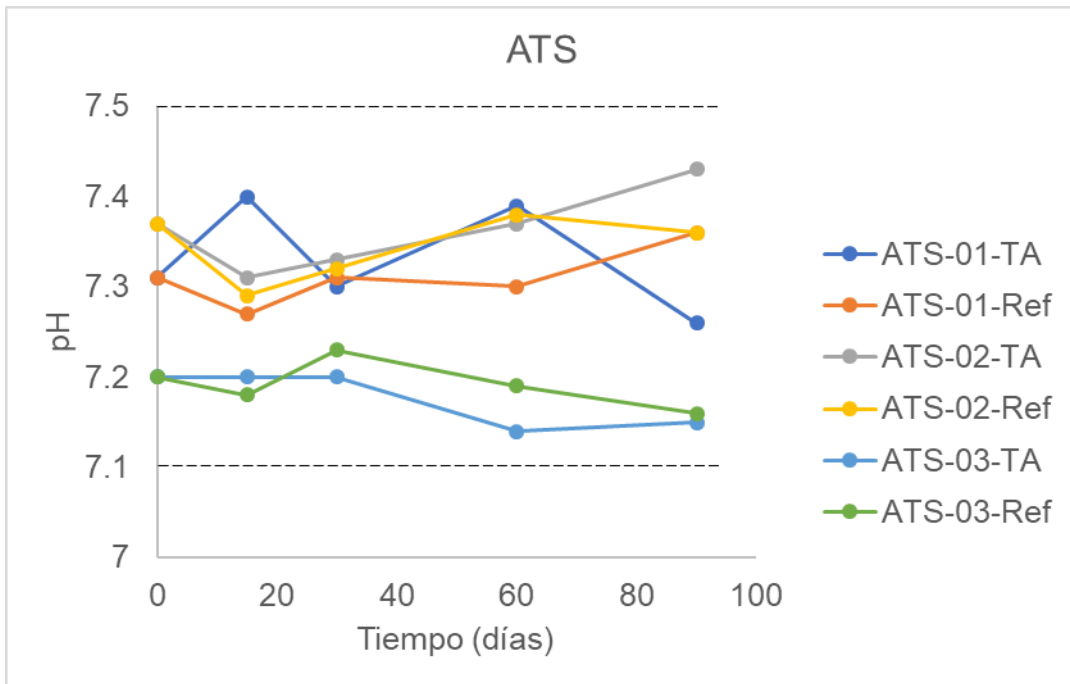


Figura 4. Medidas de pH de los lotes de Agar Tripticasa de Soya fabricados.

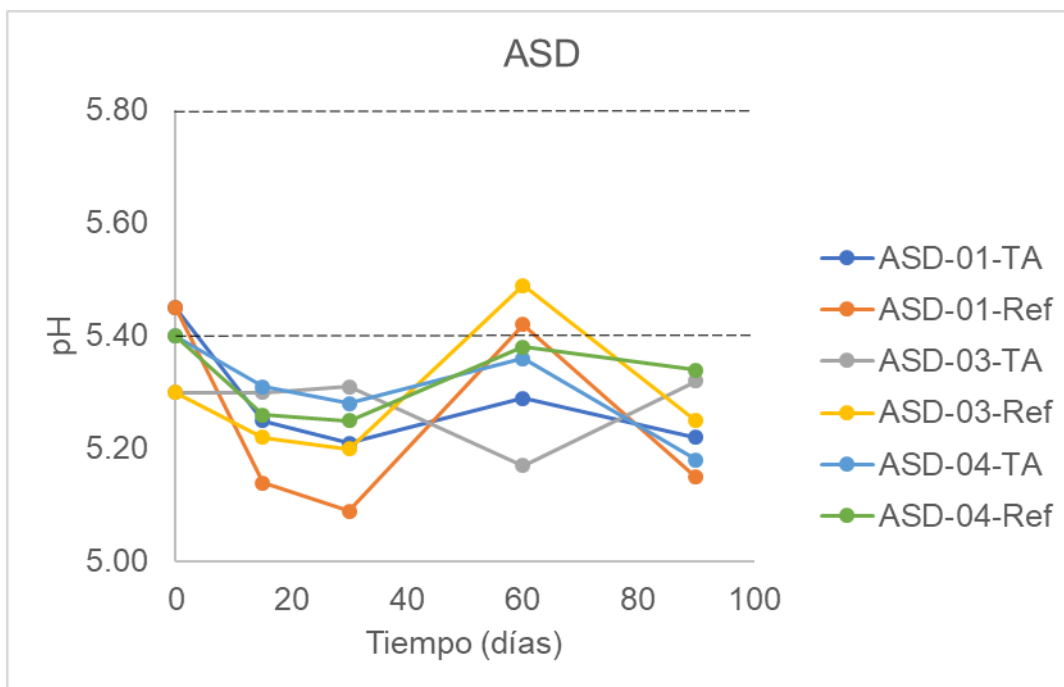


Figura 5. Medidas de pH de los lotes de Agar Sabouraud Dextrosa fabricados.

3. Prueba de Promoción de los Medios de Cultivo

Tabla 13. Promoción de Medios de Cultivo de CTS80-01 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	0	15	30	60	90
<i>S.aureus</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>P.aeruginosa</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>B.subtilis</i>	Si	Si	Si	Si	Si
Control	No	No	No	No	No

Nota: Un resultado “Sí” indica que el crecimiento de microorganismos es evidente por la aparición de turbidez del medio. “No” indica que la muestra está aún estéril y no hay contaminación de mesófilos aerobios.

Tabla 14. Promoción de Medios de Cultivo de CTS80-01 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	0	15	30	60	90
<i>S.aureus</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>P.aeruginosa</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>B.subtilis</i>	Si	Si	Si	Si	Si
Control	No	No	No	No	No

Nota: Un resultado “Sí” indica que el crecimiento de microorganismos es evidente por la aparición de turbidez del medio. “No” indica que la muestra está aún estéril y no hay contaminación de mesófilos aerobios.

Tabla 15. Promoción de Medios de Cultivo de CTS80-02 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	0	15	30	60	90
<i>S.aureus</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>P.aeruginosa</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>B.subtilis</i>	Si	Si	Si	Si	Si
Control	No	No	No	No	No

Nota: Un resultado “Sí” indica que el crecimiento de microorganismos es evidente por la aparición de turbidez del medio. “No” indica que la muestra está aún estéril y no hay contaminación de mesófilos aerobios.

Tabla 16. Promoción de Medios de Cultivo de CTS80-02 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	0	15	30	60	90
<i>S.aureus</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>P.aeruginosa</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>B.subtilis</i>	Si	Si	Si	Si	Si
Control	No	No	No	No	No

Nota: Un resultado “Sí” indica que el crecimiento de microorganismos es evidente por la aparición de turbidez del medio. “No” indica que la muestra está aún estéril y no hay contaminación de mesófilos aerobios.

Tabla 17. Promoción de Medios de Cultivo de CTS80-03 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	0	15	30	60	90
<i>S.aureus</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>P.aeruginosa</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>B.subtillis</i>	Si	Si	Si	Si	Si
Control	No	No	No	No	No

Nota: Un resultado “Sí” indica que el crecimiento de microorganismos es evidente por la aparición de turbidez del medio. “No” indica que la muestra está aún estéril y no hay contaminación de mesófilos aerobios.

Tabla 18. Promoción de Medios de Cultivo de CTS80-03 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	0	15	30	60	90
<i>S.aureus</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>P.aeruginosa</i>	Si	Si	Si	Si	Si
<i>B.subtillis</i>	Si	Si	Si	Si	Si
Control	No	No	No	No	No

Nota: Un resultado “Sí” indica que el crecimiento de microorganismos es evidente por la aparición de turbidez del medio. “No” indica que la muestra está aún estéril y no hay contaminación de mesófilos aerobios.

Tabla 19. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-01 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>S.aureus</i>	76	71	64	81	55
<i>P.aeruginosa</i>	45	38	19	40	52
<i>B.subtilis</i>	103	122	136	111	103
<i>C.albicans</i>	52	69	83	62	58
<i>A.brasiliensis</i>	69	74	60	98	95
Control	0	0	0	0	0

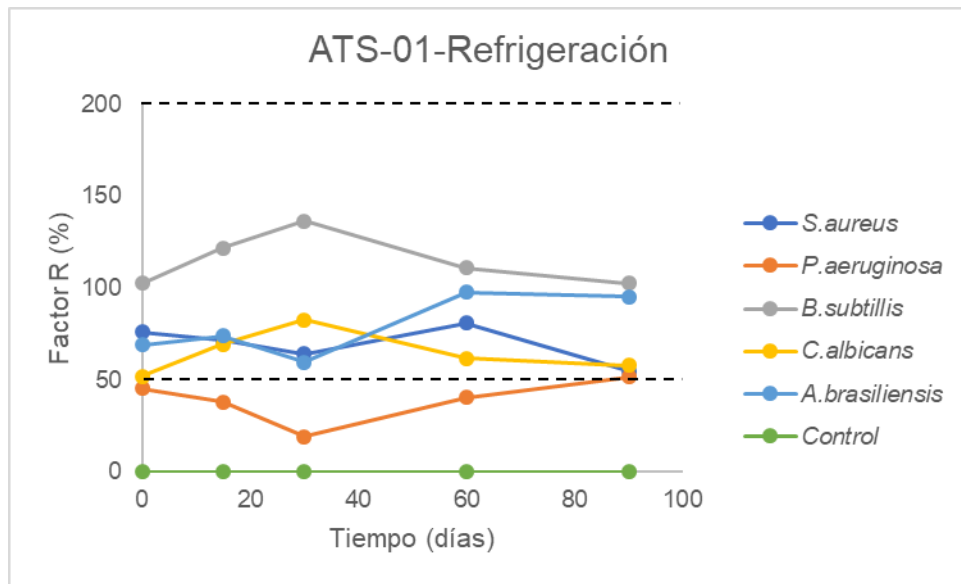


Figura 6. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-01 almacenados en refrigeración.

Tabla 20. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-01 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>S.aureus</i>	76	69	52	71	55
<i>P.aeruginosa</i>	45	45	12	40	55
<i>B.subtilis</i>	103	108	111	112	99
<i>C.albicans</i>	52	65	94	60	65
<i>A.brasiliensis</i>	69	90	71	79	100
Control	0	0	0	0	0

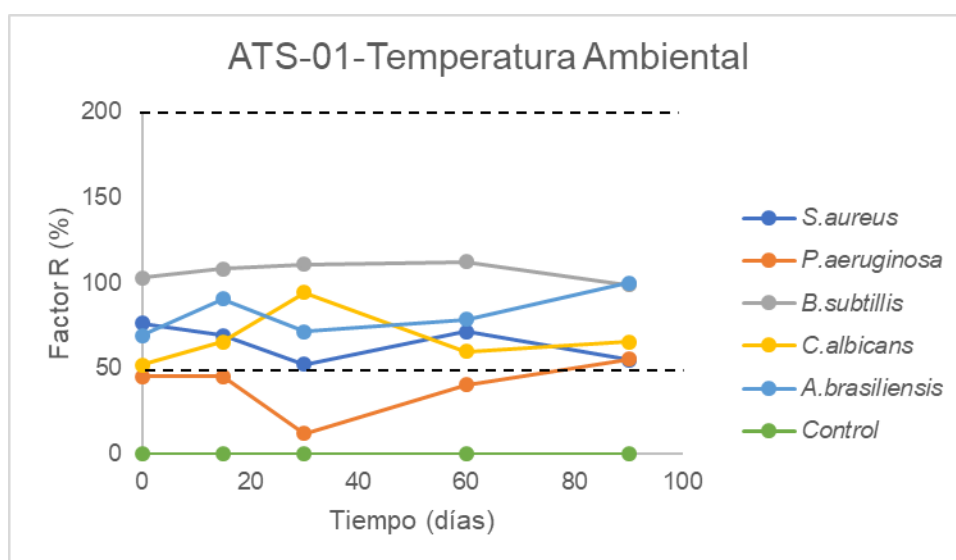


Figura 7. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-01 almacenados en temperatura ambiental.

Tabla 21. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-02 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>S.aureus</i>	98	83	79	64	71
<i>P.aeruginosa</i>	40	57	26	24	48
<i>B.subtilis</i>	174	99	89	89	73
<i>C.albicans</i>	69	85	58	77	69
<i>A.brasiliensis</i>	79	102	83	71	79
Control	0	0	0	0	0

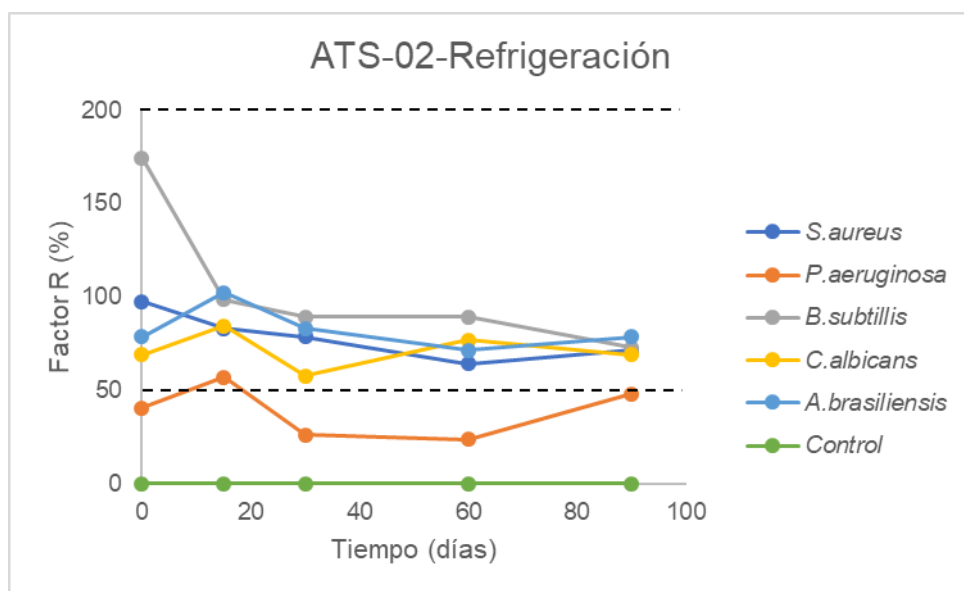


Figura 8. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-02 almacenados en refrigeración.

Tabla 22. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-02 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>S.aureus</i>	98	62	74	52	81
<i>P.aeruginosa</i>	40	67	43	17	55
<i>B.subtilis</i>	174	126	112	97	81
<i>C.albicans</i>	69	85	63	73	85
<i>A.brasiliensis</i>	79	57	98	74	69
Control	0	0	0	0	0

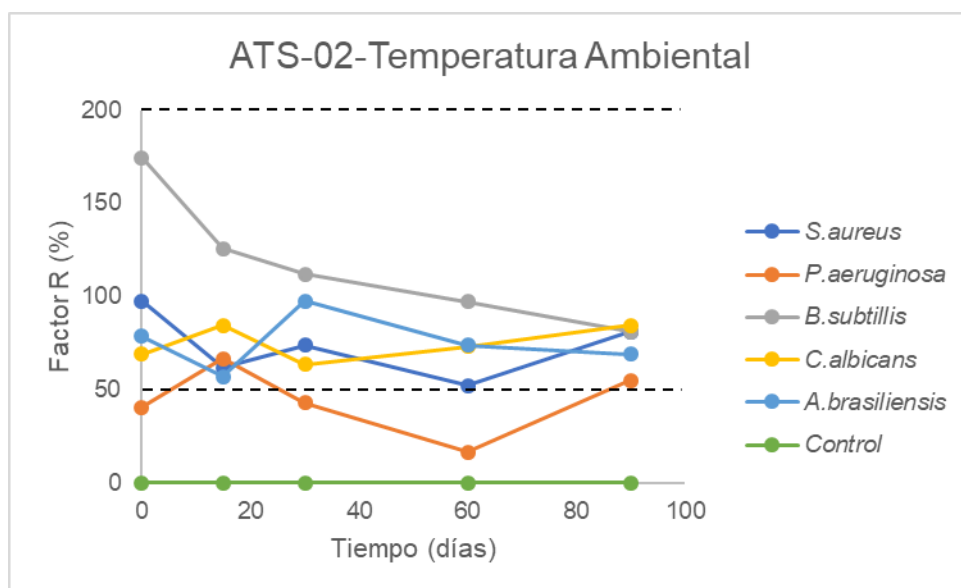


Figura 9. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-02 almacenados en temperatura ambiental.

Tabla 23. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-03 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>S.aureus</i>	79	50	74	50	86
<i>P.aeruginosa</i>	55	17	24	24	50
<i>B.subtilis</i>	108	145	100	108	72
<i>C.albicans</i>	69	65	63	87	77
<i>A.brasiliensis</i>	88	50	90	71	76
Control	0	0	0	0	0

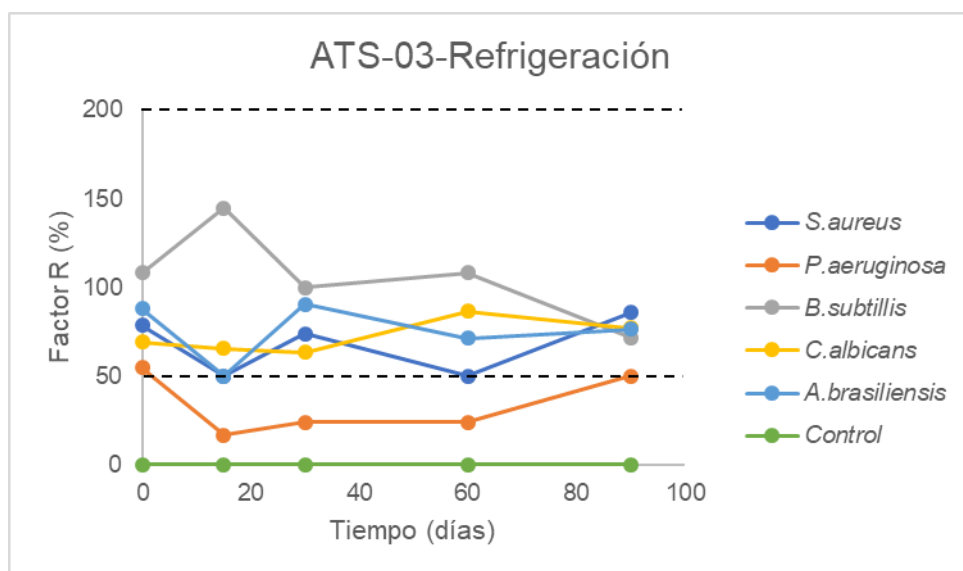


Figura 10. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-03 almacenados en refrigeración.

Tabla 24. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-03 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>S.aureus</i>	79	57	55	52	90
<i>P.aeruginosa</i>	55	29	45	10	57
<i>B.subtilis</i>	108	153	97	99	95
<i>C.albicans</i>	69	69	58	87	69
<i>A.brasiliensis</i>	88	55	102	79	83
Control	0	0	0	0	0

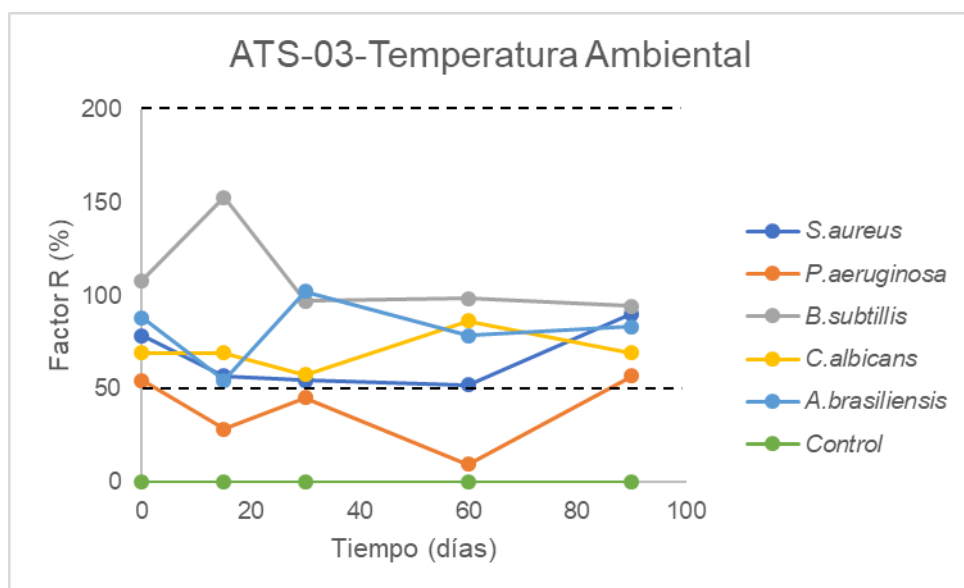


Figura 11. Promoción de Medios de Cultivo de ATS-03 almacenados en temperatura ambiental.

Tabla 25. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-01 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>C.albicans</i>	96	75	96	62	54
<i>A.brasiliensis</i>	52	86	74	81	69
Control	0	0	0	0	0

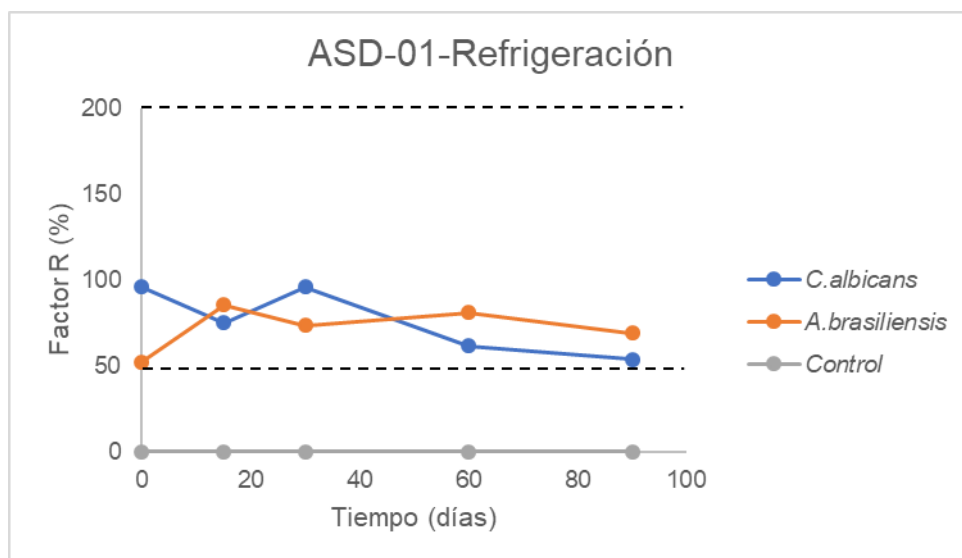


Figura 12. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-01 almacenados en refrigeración.

Tabla 26. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-01 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>C.albicans</i>	96	87	83	60	50
<i>A.brasiliensis</i>	52	67	71	79	67
Control	0	0	0	0	0

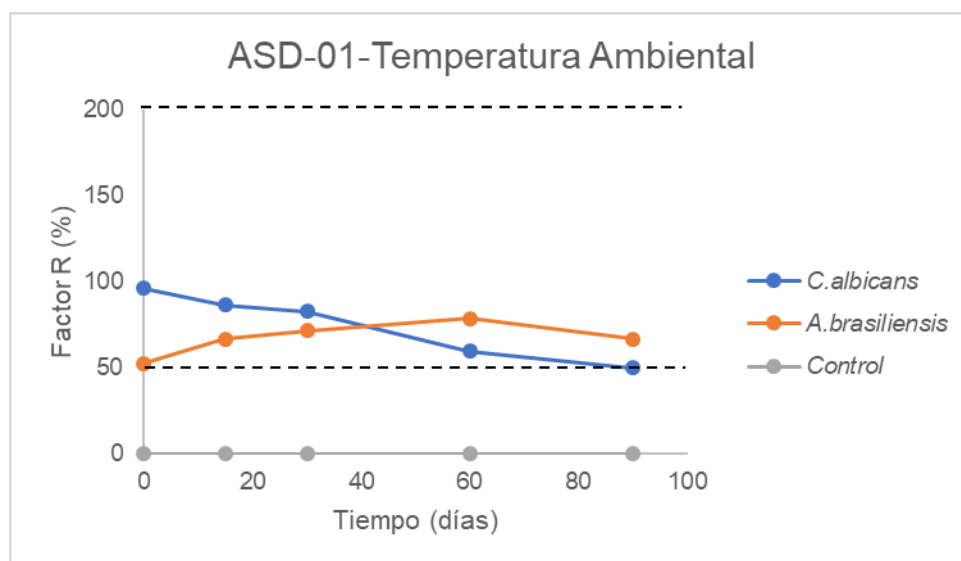


Figura 13. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-01 almacenados en temperatura ambiental.

Tabla 27. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-03 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>C.albicans</i>	71	81	67	75	102
<i>A.brasiliensis</i>	55	83	105	55	69
Control	0	0	0	0	0

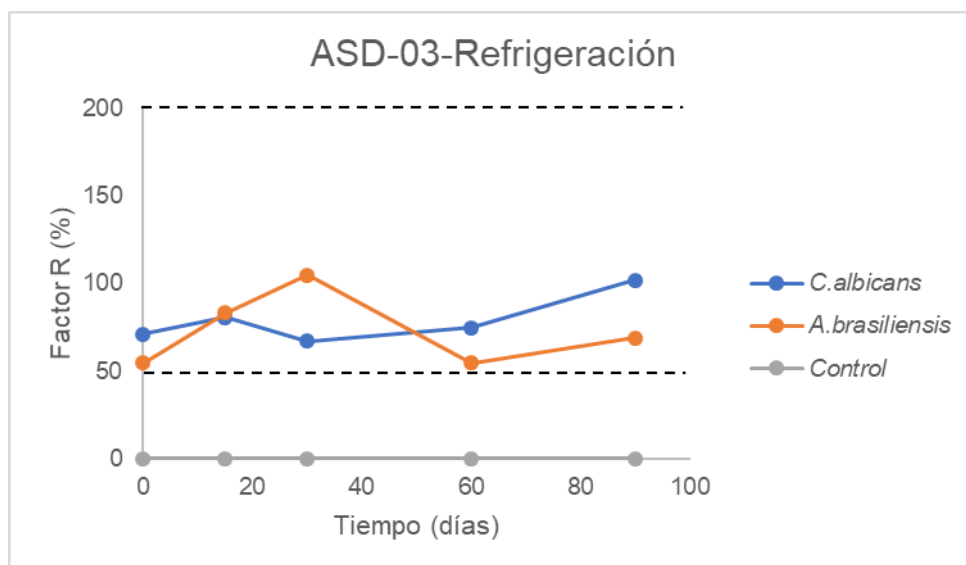


Figura 14. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-03 almacenados en refrigeración.

Tabla 28. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-03 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>C.albicans</i>	71	92	56	88	81
<i>A.brasiliensis</i>	55	69	69	57	69
Control	0	0	0	0	0

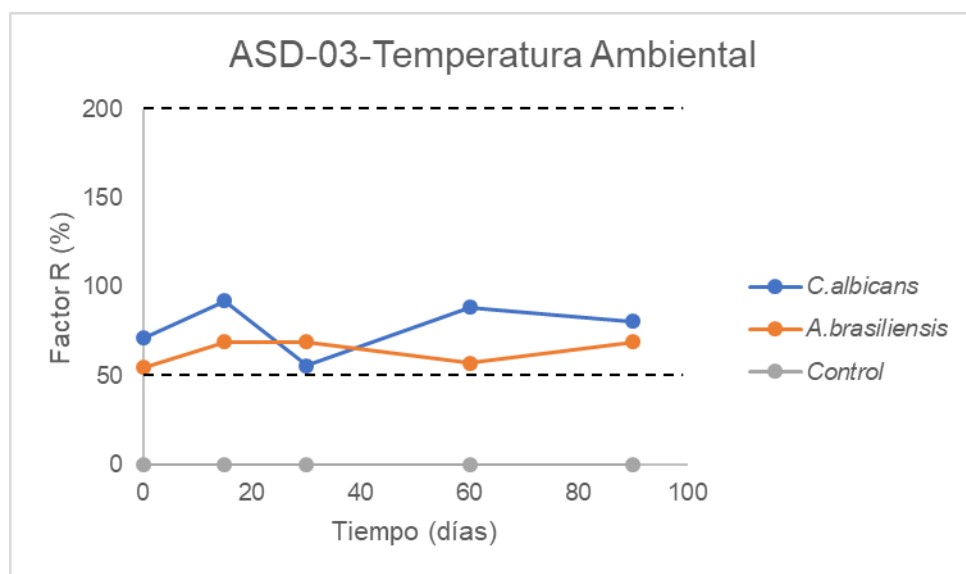


Figura 15. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-03 almacenados en temperatura ambiental.

Tabla 29. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-04 almacenados en refrigeración.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>C.albicans</i>	81	65	58	85	88
<i>A.brasiliensis</i>	76	112	88	55	86
Control	0	0	0	0	0

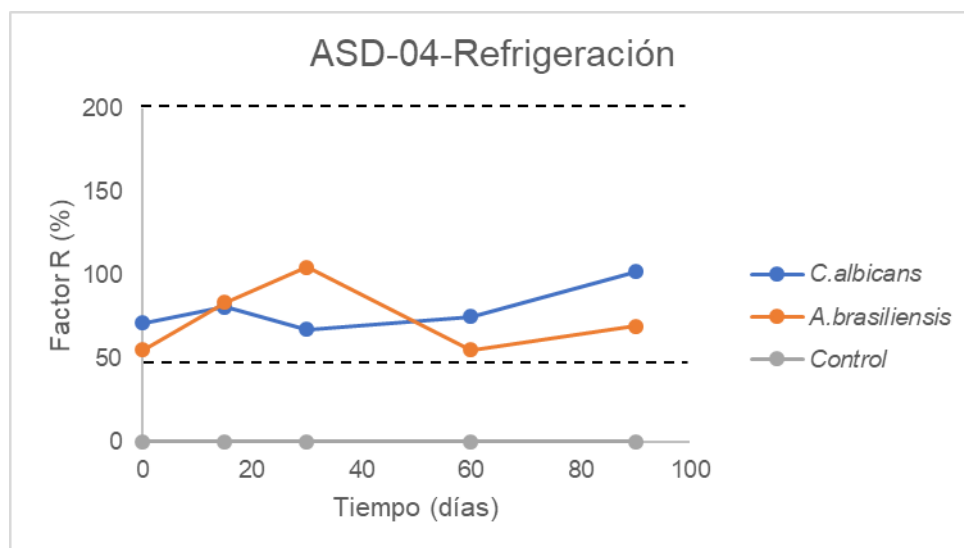


Figura 16. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-04 almacenados en refrigeración.

Tabla 30. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-04 almacenados en temperatura ambiental.

Microorganismo utilizado	Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90
<i>C.albicans</i>	81	104	69	88	75
<i>A.brasiliensis</i>	76	81	62	55	79
Control	0	0	0	0	0

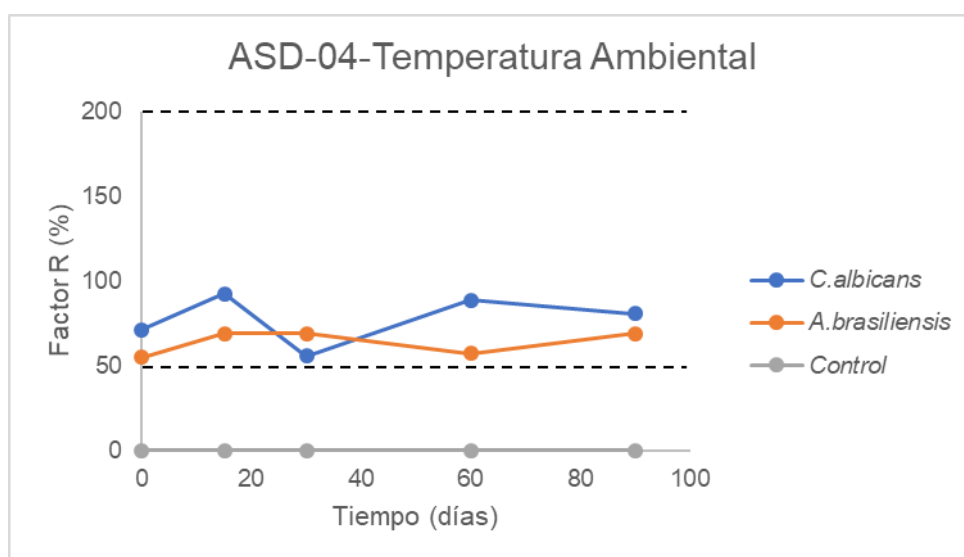


Figura 17. Promoción de Medios de Cultivo de ASD-04 almacenados en temperatura ambiental.

Actualización de la Prueba de Recuento Microbiano

Los nuevos cambios y la propuesta del cambio del procedimiento se detallan en el Anexo 4.

Tabla 31. Productos de análisis rutinario del LNCM.

Código Proyecto	PRODUCTO	FABRICANTE
A1	Ungüento Ácido Salicílico Tubo 45 g Vía Tópica.	Laboratorio A
A2		
A3		
B1	Crema de Rosas Tubo 40 g Vía Tópica.	Laboratorio A
B2		
B3		
C1	Solución Oral de Clorfenamina Maleato Frascos 110 mL	Laboratorio A
C2		
C3		
D1	Polvo Para Suspensión Oral Colestiramina Resina Anhidra. Sobre con 9 g Vía Oral.	Laboratorio B
D2		
D3		

Nota: La información correspondiente al número de lote, identificación de la muestra, artes primarios y secundarios fueron verificados; sin embargo, no se muestran por ser información confidencial, pero para efectos del proyecto, cada código indica un número de lote diferente y un código de laboratorio.

Tabla 32. Lotes de medios de cultivo utilizados para el análisis de recuento microbiano.

Código Proyecto	Fecha Inicial Recuento	Fecha Final Recuento	Lote CTS80	Lote ATS	Lote ASD
A1	2019-02-13	2019-02-18	CTS80-01	ATS-01	ASD-01
A2	2019-06-05	2019-06-10	CTS80-02	ATS-03	ASD-04
A3	2019-03-01	2019-03-05	CTS80-01	ATS-01	ASD-01
B1	2019-02-13	2019-02-18	CTS80-01	ATS-01	ASD-01
B2	2019-03-01	2019-03-05	CTS80-01	ATS-01	ASD-01
B3	2019-06-05	2019-06-10	CTS80-02	ATS-03	ASD-04
C1	2019-06-05	2019-06-10	CTS80-02	ATS-03	ASD-04
C2	2019-03-01	2019-03-05	CTS80-01	ATS-01	ASD-01
C3	2019-02-13	2019-02-18	CTS80-01	ATS-01	ASD-01
D1	2019-03-01	2019-03-05	CTS80-01	ATS-01	ASD-01
D2	2019-06-05	2019-06-10	CTS80-02	ATS-03	ASD-04
D3	2019-02-13	2019-02-18	CTS80-01	ATS-01	ASD-01

Tabla 33. Controles de las Pruebas de Recuento Microbiano. (cantidades en UFC/placa)

Código Proyecto	Control Ambiental ATS	Control Ambiental ASD	Placa Control
A1	1	0	0
A2	0	0	0
A3	0	0	0
B1	1	0	0
B2	0	0	0
B3	0	0	0
C1	0	0	0
C2	0	0	0
C3	1	0	0
D1	0	0	0
D2	0	0	0
D3	1	0	0

Tabla 34. Resultados obtenidos de la prueba de recuento microbiano. (cantidades en UFC/placa)

Código Proyecto	Placa 1	Placa 2	Promedio	DS
A1	0	0	< 10 UFC/g	0
A2	0	0	< 10 UFC/g	0
A3	0	0	< 10 UFC/g	0
B1	0	0	< 10 UFC/g	0
B2	0	0	< 10 UFC/g	0
B3	0	0	< 10 UFC/g	0
C1	0	0	< 10 UFC/mL	0
C2	0	0	< 10 UFC/mL	0
C3	0	0	< 10 UFC/mL	0
D1	0	0	< 10 UFC/g	0
D2	0	0	< 10 UFC/g	0
D3	0	0	< 10 UFC/g	0

Verificación de la Aptitud del Método de Recuento Microbiano

Tabla 35. Prueba de Aptitud del Producto A1 del Ungüento de Ácido Salicílico. (cantidades en UFC/placa)

Microorganismo utilizado	Etiquetado UFC/pellet	Recuperación media en ausencia del producto		Recuperación media en presencia del producto		Factor Recuperación	
		RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA	RTCHL
<i>S.aureus</i>	42	5		3		60	
<i>P.aeruginosa</i>	42	3		3		100	
<i>B.subtilis</i>	74	6		6		100	
<i>C.albicans</i>	52	4	3	5	4	125	133
<i>A.brasiliensis</i>	42	3	4	2	3	67	75
Control	NA	0	0	0	0	0	0

Tabla 36. Prueba de Aptitud del Producto B1 de la Crema de Rosas. (cantidades en UFC/placa)

Microorganismo utilizado	Etiquetado UFC/pellet	Recuperación media en ausencia del producto		Recuperación media en presencia del producto		Factor Recuperación	
		RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA	RTCHL
<i>S.aureus</i>	42	5		9		180	
<i>P.aeruginosa</i>	42	3		6		200	
<i>B.subtilis</i>	74	6		8		133	
<i>C.albicans</i>	52	4	3	4	4	100	133
<i>A.brasiliensis</i>	42	3	4	3	5	100	125
Control	NA	0	0	0	0	0	0

Tabla 37. Prueba de Aptitud del Producto C3 de la Solución Oral de Clorfenamina. . (cantidades en UFC/placa)

Microorganismo utilizado	Etiquetado UFC/pellet	Recuperación media en ausencia del producto		Recuperación media en presencia del producto		Factor Recuperación	
		RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA	RTCHL
<i>S.aureus</i>	42	5		4		80	
<i>P.aeruginosa</i>	42	3		2		67	
<i>B.subtilis</i>	74	6		6		100	
<i>C.albicans</i>	52	4	3	3	5	75	167
<i>A.brasiliensis</i>	42	3	4	6	3	200	75
Control	NA	0	0	0	0	0	0

Tabla 38. Prueba de Aptitud del Producto D3 del Polvo para reconstitución oral de Colestiramina Resina Anhidra. (cantidades en UFC/placa)

Microorganismo utilizado	Etiquetado UFC/pellet	Recuperación media en ausencia del producto		Recuperación media en presencia del producto		Factor Recuperación	
		RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA (UFC/mL)	RTCHL (UFC/mL)	RTMA	RTCHL
<i>S.aureus</i>	42	5		3		60	
<i>P.aeruginosa</i>	42	3		2		67	
<i>B.subtilis</i>	74	6		9		150	
<i>C.albicans</i>	52	4	3	3	5	75	167
<i>A.brasiliensis</i>	42	3	4	6	3	200	75
Control	NA	0	0	0	0	0	0

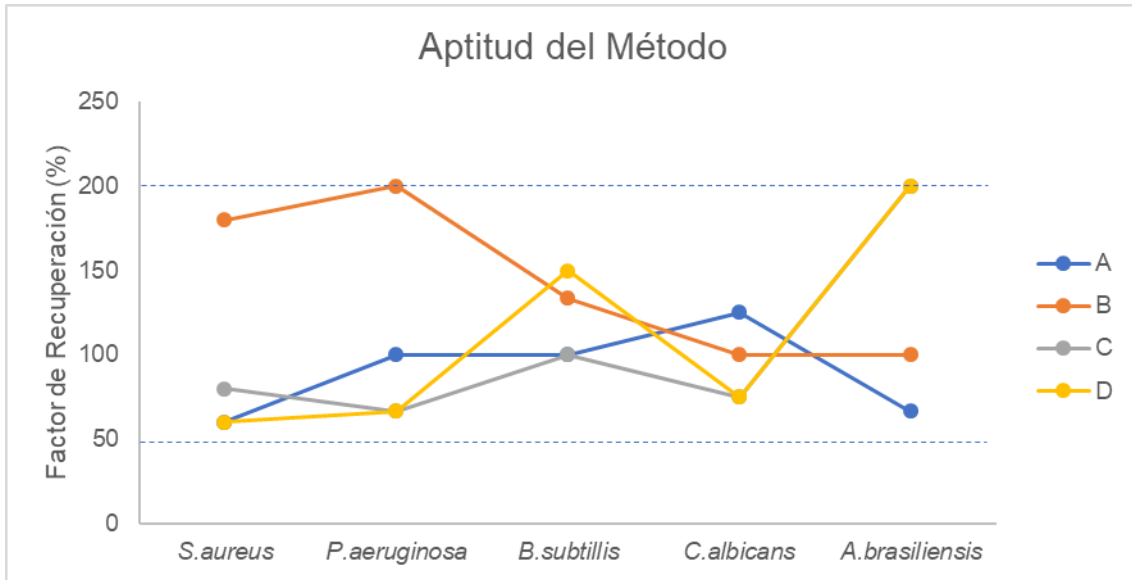


Figura 18. Factor de Recuperación R para la prueba de Aptitud de la prueba con los microorganismos correspondientes.

DISCUSIÓN

Identificación de las mejores prácticas y recomendaciones internacionales para la fabricación de medios de cultivo

Como se observa en la Tabla 5 se puede observar que es sumamente importante que en cada paso del manejo es esencial la trazabilidad, puesto que la calidad del medio puede variar desde la fabricación del medio (aunque esta labor ya no compete a los fabricantes de medios de cultivo a partir de medios deshidratados) hasta la elaboración, el almacenamiento post-fabricación y el uso de estos. Por lo que, para asegurar la trazabilidad se debe verificar toda la documentación arraigado al medio de cultivo, incluyendo los certificados de análisis de estos y asegurarse de que los análisis realizados cumplan con las especificaciones establecidas por el fabricante.

Se puede observar que varios aspectos son recomendados por la mayoría de las referencias farmacopeicas y normativas; además, incluso manuales de microbiología. Pero la mayoría de los aspectos están contemplados en la referencia de ISO 11134:2014 en cuanto a todo lo relacionado a medios de cultivos. Además, los manuales dan buenas guías sobre buenas prácticas del manejo de los medios de cultivo y detallan pasos que las normativas no mencionan.

Se debe considerar un aspecto importante la verificación de las aguas dentro del laboratorio, es por eso que el agua se toma como una sección aparte detallando todas las características en las que podría afectar al medio de cultivo. Dentro del Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos, se puede considerar que en el instructivo técnico LNCM-IT-230-1 se establecen los parámetros asociados a la producción de agua, los parámetros de calidad del agua, el control de limpieza y sanitización, análisis de control microbiológico e inspección del sistema de cloración del agua potable de suministro que influyen directamente en la contaminación y la conductividad del agua. Todo esto puede afectar el pH posterior del medio de cultivo. En el proyecto, no se realizaron las mediciones de pH de agua debido a que según los registros de preparación de medios, generalmente no se realizan ajustes de pH y el agua es de calidad desionizada y por ende, usualmente neutra con un pH entre 5.5 y 7.5.

Se puede notar que el ISO recomienda usar el medio de cultivo fundido (*re-melting*) dentro de 4 horas posterior a fundir el medio; sin embargo, la USP menciona 8 horas. Por lo tanto, se debe establecer el tiempo para cada laboratorio. En todo caso, se puede asumir el peor caso y tomar en cuenta las 4 horas posterior a fundir el medio y estandarizar este paso. Para los procedimientos realizados en este proyecto, se esperó al menos 1 hora para que el medio de cultivo no se encuentre tan caliente tal que pueda matar las bacterias examinadas. El LNCM cuenta con un termómetro infrarrojo destinado para medir la temperatura del medio de cultivo sólido antes de la utilización para verificar que se encuentre dentro de los rangos entre 42 y 45°C.

Teniendo el procedimiento de preparación definido, se puede proceder a una validación clara y concisa que pueda generar datos reproducibles, trazables y genere productos de calidad consistentemente comprobados por una documentación.

Validación del Procedimiento de Preparación de Medios de Cultivo

Los procedimientos no pueden ser validados si no existen puntos de control en el proceso. Por lo tanto, se observa en la tabla 6 un resumen de los puntos críticos de medición antes de realizar análisis de la calidad de los medios de cultivos.

Se puede observar en la Tabla 6 que el pesado de los medios de cultivo no sobrepasan 1% de error (error máximo permitido según ISO 11134:2014), eso es sencillo cuando utiliza una balanza con la capacidad para medir las cantidades pesadas; sin embargo, el último dato de masa de CTS80-03, debe tomarse en cuenta que se realizaron 2 pesadas, debido a que la cantidad requerida a pesar sobrepasa la capacidad máxima de la balanza, por lo que el error puede aumentar. Pero -solamente en estos casos de elaboración (por el gran tamaño de lote que se están elaborando y por las bajas incertidumbres de la balanza analítica utilizada)- la suma de los errores de pesada no sobrepasan el 1%.

Se debe tomar en cuenta que el volumen preparado indicado en la Tabla 6, se mide la cantidad aproximadamente medida con probeta Clase A, como indica en la ISO 11134:2014 (21), y no realiza un complementario de “cantidad suficiente para” el volumen indicado, eso indica que finalmente cuando se tiene el volumen total del medio, sobrepasa la cantidad que indica en la tabla.

El volumen de envasado es un determinante, aunque no crítico, de la distribución de vapor en el medio cuando se esté realizando el autoclavado. Solo si los volúmenes sobrepasan 1000 mL por envase (21), se debe tomar en cuenta que el ciclo de esterilización debe modificarse en cuanto a tiempo para alcanzar la esterilización y que todos los puntos del medio alcancen la temperatura de 121 °C, pero en estos casos, la distribuirse los medios en volúmenes pequeños, se evita este inconveniente.

Otro aspecto por considerar en cuanto al volumen de envasado se trata de que el volumen disminuye después de la esterilización, por lo que se debe estandarizar con un volumen de llenado mayor, para que la dilución 1:10 correspondiente a la prueba de recuento microbiano sea cuantitativo. Este factor fue estudiado dentro del LNCM en otras investigaciones internas y se estandarizó un volumen de 97-99 mL previo a

esterilización para los CTS, por lo que se sigue este método para dispensar el volumen de CTS80.

Calentar el medio de cultivo que contiene péptidos, azúcares, vitaminas, minerales y metales provoca la destrucción de nutrientes, ya sea una degradación térmica o una reacción entre los componentes de los medios. De hecho, se puede observar que el pH de los Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) tiende a disminuir en mayor medida el valor de pH. Esto se debe a que los azúcares son fácilmente caramelizados a altas temperaturas y por ende puede disminuir el pH después de someter a esterilización (55). Por lo tanto, el ASD se encuentra fuera de especificación después de esterilizar.

Por otro lado, el ISO 11134:2014 establece que *el pH de los medios debe estar en un rango de ± 0.2 del valor indicado por el fabricante, a menos que un rango más amplio sea aceptable por el método validado (21)*, por lo tanto, este rango de pH puede ser aumentado si y sólo si, no contribuyen a afectar los demás atributos de calidad (Promoción de medios de cultivo e Inspección visual, siendo el primero el de mayor peso ya que los microorganismos determinarán si esa condición es idóneo para su crecimiento).

Claramente en todas las partes del proceso debe controlarse para verificar que realmente fueron examinados, es por eso que la documentación de cada uno de los pasos se vuelve esencial y previamente a la preparación, se verificaron todos los datos de equipos y materias primas para asegurar que cumplen con las cualidades requeridas. Estas se pueden ver en la validación de los medios de cultivo Anexo 2. Todos los requisitos cumplen con los requerimientos de validación, calibración o verificación y las fechas de expira de todas las materias primas se encuentran vigentes.

Claramente, la inspección visual es primordial, sobre todo cuando la esterilidad del medio de cultivo se verifica con respecto a la turbidez de la solución como es el caldo CTS80, por lo tanto, debe cumplir y efectivamente todos los medios (cada uno de ellos) cumplen con la apariencia como aparece en la tabla de apariencia, al menos hasta la fecha establecida de vencimiento (lo cual se menciona más adelante).

Según la guía de aseguramiento de calidad para medios de cultivo microbiológicos de uso médico (o farmacéutico) de la Sociedad Australiana para Microbiología, para realizar una validación o para que un proceso o medio esté validado, la recolección de los datos debe demostrar la reproducibilidad de una propiedad específica de un medio o de un proceso. Los datos deben documentarse debidamente y deben verificar que, con las condiciones usuales del laboratorio, el medio o proceso es confiable en producir metas esperadas o especificaciones establecidas. (36) De acuerdo con lo anterior, se debe documentar todos los puntos del proceso como lo registrado en la Tabla 6, además, se debe cumplir especificaciones de calidad preestablecidas de los análisis que califican al proceso o al producto, estos se encuentran en el protocolo de validación del Anexo 2 y cumplir con estas para poder establecerse el procedimiento como “Validado.”

Como se mencionó en marco teórico, las cualidades atribuibles a la calidad de los medios de cultivo se establecen con 3 procesos: la Promoción de Medios de Cultivo, la acidez del medio y la inspección visual, además, debe tomar en cuenta que las últimas 2 también son aplicables antes de la esterilización, por lo que se pueden observar en las tablas 7, 8 y 9 el análisis tanto antes como después de esterilizar.

El medio de cultivo CTS80 cumple con todas las especificaciones de calidad preestablecidas, por lo que se emite un CONFORME sea para los lotes de 9 litros como para el de 20 litros. La duda es por qué se puede emitir un VALIDADO, cuando dos lotes son de 9 litros mientras que un lote es de 20 litros. Para esto, se necesita discutir acerca de un concepto de validación llamado “*Bracketing*” lo cual es usado muy frecuentemente en estudios de estabilidad debido a que *asumen los peores escenarios* matrizando un rango del mínimo y máximo, posteriormente evaluando ambos extremos para validar. Por consiguiente, cuando los casos extremos son calificados, se interpola todos los datos entre ambos puntos extremos, esto puede disminuir los recursos económicos, materiales, de personal y de tiempo para industrias transnacionales e industrias de fabricación de grandes lotes y en este caso de lotes de medios de cultivo, ya que las muestras analizadas mediante Recuento Microbiano no son cantidades pequeñas. (56)

Ahora, de acuerdo con la Tabla 8 sobre los análisis de ATS, se puede observar que el factor R de la prueba de Promoción de Crecimiento, se encuentra por debajo de la especificación. Con base en el resultado fuera de especificación, se realizó investigaciones adicionales para encontrar la razón del porqué para *P. aeruginosa* no logra alcanzar un crecimiento adecuado de microorganismos mientras con los otros microorganismos sí permite un crecimiento que cumplen las especificaciones y de hecho pasa con la mayoría de veces que se examina con esta bacteria con cualquier medio analizado (los demás resultados se pueden observar registrados en Anexo 3), por lo que se pensaría primeramente si la cepa es la adecuada para examinar la promoción.

En la bibliografía pertinente a *Microbiologics*® (laboratorio fabricante de las cepas), recomiendan que se promueve mejor el crecimiento si se aplica el método de extensión en superficie; sin embargo, ¿por qué solamente el *P. aeruginosa*? En las referencias pertinentes indican que las características de *P.aeruginosa* es una bacteria aerobia facultativa, eso indica que puede crecer tanto en condiciones en presencia o ausencia de oxígeno. Sin embargo, el *P. aeruginosa* es una bacteria que prefiere un ambiente oxidativo, por lo que se presenta mayor facilidad de crecimiento si se realizara por extensión en superficie y de hecho los análisis del laboratorio fabricante emplean un equipo llamado *Spiral Biotech*, lo cual es un método de extensión en superficie de manera espiral-paralelo. (57) Por esta razón, se realizó una investigación al probar el método de recuento por extensión en superficie; sin embargo, no se alcanzó éxito, como se observa en la siguiente figura:

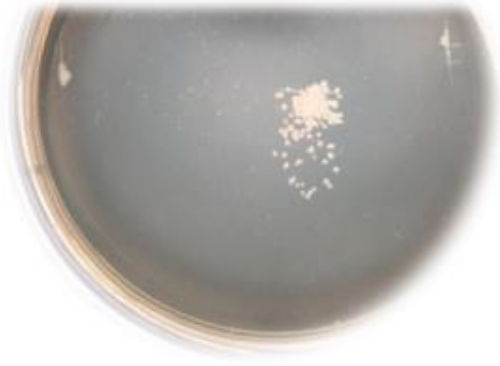


Figura 19a. Método de extensión en superficie al primer día de incubación.

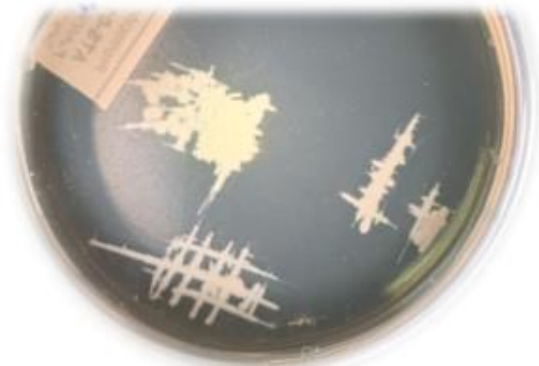


Figura 19b. Método de extensión en superficie al segundo día de incubación.

Claramente, el “fracaso” de obtener una respuesta que aparece en las figuras anteriores puede deberse a la falta de técnicas de laboratorio del analista o debido a que el asa estéril de plástico utilizado no sea suficiente como para extender el microorganismo en la superficie de la placa.

Al obtener los resultados anteriores, se investiga con otro factor de error que podría conllevar a tener resultados fuera de especificación. Por medio de un cambio de cepa se pudo obtener un factor de recuperación R aceptable. Este cambio se realizó hasta la prueba en la última fecha de los 90 días debido a los siguientes aspectos:

- Debido a que el lote de *P.aeruginosa* tiene como fecha de caducidad el 31 de Julio de 2019 (en cercanías de la fecha de vencimiento, tomando en cuenta que tiene 1 año de validez y se encuentra en el mes 9 a 11)
- Se terminó la cepa microbiológica *P. aeruginosa* anterior, por lo que se procede a cambiar la cepa.

En cuanto al primer punto podría dudarse del producto por parte del proveedor de las cepas microbiológicas y podría solicitarse una investigación o el cambio de las cepas estandarizadas para futuras ocasiones, ya que las cepas deberían cumplir especificaciones de calidad preestablecidas hasta la fecha de expira.

Asumiendo el peor caso, en estas ocasiones, el Agar Trypticasa de Soya a los 90 días después de la elaboración del medio de cultivo y teniendo una cepa microbiológica

nueva, se tiene que este medio de cultivo antes de los 90 días tendría valores dentro de especificaciones de calidad y que los microorganismos *S. aureus*, *B. subtilis*, *A. niger* y *C. albicans* también cumplen los resultados dentro de las especificaciones de calidad hasta esta fecha, entonces se podría asumir, con la pendiente de la investigación del proveedor de cepas, que los medios ATS satisfacen las necesidades del crecimiento de microorganismos.

En cuanto al medio de cultivo de Agar Sabouraud Dextrosa, las pruebas de inspección y promoción obtienen resultados conformes; sin embargo, uno de los atributos de calidad críticos no se encuentra conforme, por lo tanto, el procedimiento de elaboración de medio de cultivo ASD tiene como resultado NO CONFORME y este no está validado, por lo que sería apropiado buscar oportunidades de mejora para validar el procedimiento de fabricación de ASD para que la acidez se encuentre dentro de especificaciones. Este problema está arraigado a varios factores:

- Como se mencionó anteriormente, los azúcares tienden a caramelizarse después de someterse a altas temperaturas y esto puede conllevar a disminuir el pH del ASD.
- El pH del agua puede estar muy ácido, empero este factor no es tan válido debido a que los otros medios de cultivo se realizan en los mismos días que el ASD, por lo que el pH del agua de los 3 medios debería verse afectado.
- El período de validez del ASD es tan corto que debería usarse apenas se termina de esterilizarse y elaborarse y no puede durar más de una semana.
- El pH se encuentra fuera de especificación debido a que los medios deshidratados no fueron almacenados correctamente o no tienen la composición adecuada de componentes.

Empero todos los factores anteriores no son suficientemente convincentes, debido a que el ASD ha permitido el crecimiento de hongos y levaduras a pH menores y según la Sociedad Australiana para Microbiología, la promoción debe ser la prueba de confirmación de la calidad del medio de cultivo. Sin embargo, al tratarse de un laboratorio de normas y calidad de medicamentos, no es una razón para usar una materia prima cuando se encuentra fuera de rango de pH, siendo un atributo de calidad

crítico. Por ende, se debe realizar más pruebas, solicitar al fabricante de medios deshidratados una investigación o cambiar de fabricante de medios deshidratados. Por otro lado, el LNCM no puede no producir ASD debido a que diariamente entran lotes para analizar, pero la prueba de promoción garantiza que puede cuantificar hongos y levaduras y estas cumplen dentro del factor, solo que el procedimiento aún debe encontrar oportunidades de mejora y buscar cuál es el método para validar y que se encuentre dentro de las especificaciones.

Estudio de Estabilidad de los Medios de Cultivo

Como se mencionó anteriormente, para garantizar la calidad de los medios de cultivos se deben las 3 pruebas esenciales. En la Tabla 11 se puede observar que la inspección visual se encuentra conforme en todos los tiempos. Este es una prueba subjetiva debido a que es un parámetro que para una persona puede ser aceptable, para otra no. Debido a la subjetividad de esta prueba, se debe inspeccionar las otras 2 cualidades.

En las figuras 3, 4 y 5 se puede observar el valor de pH a lo largo del tiempo y se puede observar que, como se mencionó anteriormente, el ASD (figura 5) es el único medio que generalmente se encuentra fuera de especificación, por lo que no se puede determinar el período de validez del ASD. Aunque para ATS y CTS80 se puede notar cómo el pH es bastante estable con respecto al pH y no tiene una tendencia a disminuir o aumentar de pH con respecto al tiempo.

Al observar las figuras 3 y 4, entonces se puede confirmar que para el CTS80 y ATS se puede mantener los medios de cultivo por 90 días.

Sin embargo, los resultados obtenidos de pH no son los determinantes de la calidad del medio de cultivo, sino es la prueba de Promoción, como se ha mencionado anteriormente. Al observar el resumen en la Tabla 13 hasta la Tabla 18 se puede observar que los controles se encuentran estériles (turbidez ausente) y permite la lectura de “positivo” de la prueba al agregar las cepas correspondientes. Por lo tanto, CTS80 puede establecerse como fecha de vencimiento 90 días después de la fecha de elaboración.

Además, los resúmenes de las pruebas de promoción que aparecen desde la Figura 6 hasta la Figura 11 en cuanto al ATS indican en general un crecimiento de *P.aeruginosa* fuera de los límites preestablecidos. Pero como se mencionó en la sección de la validación del procedimiento de fabricación de medios, se tienen los últimos datos de las figuras 6 hasta el 11 (excepto el 8), que el crecimiento de *P.aeruginosa* a los 90 días permite el crecimiento de microorganismos dentro de especificación.

Lo ocurrido en la figura 8 puede deberse a los diversos factores, incluidos la variabilidad de los métodos de análisis microbiológicos, por lo que el dato fuera de especificación, al estar cercano al límite de especificación y a los factores estudiados y mencionados anteriormente, se toma como válido. En conclusión, el ATS permite el crecimiento de microorganismos adecuadamente hasta los 90 días (inclusive).

En cuanto a la prueba de Promoción de Medios del ASD correspondiente a las figuras 12 hasta 17 se puede observar que el ASD cumple con las especificaciones de calidad preestablecidas. Por ende, se puede definir como que el medio ASD permite la detección y el recuento de *Aspergillus niger* y *Candida albicans* hasta los 90 días.

Ahora bien, al tener las conclusiones establecidas anteriormente sin diferencias significativas entre el almacenamiento bajo refrigeración o bajo condiciones normales de almacenamiento en el área de bodegaje de la Unidad de Bioanálisis, se puede concluir que se pueden almacenar bajo las dos condiciones, siempre y cuando se mantenga las mismas condiciones de temperatura y humedad establecidas dentro de la bodega, tomando en cuenta que esta área se encuentra sólo bajo manejo de los personales capacitados dentro de la Unidad de Bioanálisis y esta unidad tiene acceso restringido para otros personales ajenos al área. Además, también tomando en cuenta que el área de almacenaje se encuentra controlado en cuanto a temperatura y humedad, registrando datos diariamente en una tabla de registros, cuando el valor se encuentra fuera de los rangos de temperatura y humedad, se debe tomar en cuenta los riesgos asociados a los medios almacenados dentro de este sitio.

Actualización de la Prueba de Recuento Microbiano

En cuanto a los cambios notorios de la prueba de Recuento microbiano establecido antes del USP31, se encuentran la eliminación de lecitina y tween 20 como agentes neutralizantes de primera instancia para el recuento. En cambio, posteriores a USP32 y acordes con Farmacopeas Japonesa y Europea, además, la F. Británica acorde con la Farmacopea Europea, recomiendan el uso como agente neutralizante el tween 80 a una concentración al 0,1%.

Otro de los aspectos a considerar es el hecho de que el instructivo actual de Control Higiénico de Productos No estériles se realiza la prueba a 3 muestras (individualmente) y se analizan individualmente, siendo estas 3 muestreadas o no según un plan de muestreo (con un valor de NCA o nivel de calidad aceptable, también llamados usualmente como AQL, por sus siglas en inglés). Mientras que en la Farmacopea de los Estados Unidos establece que *“Usar 10 g o 10 mL del producto a examinar, tomados con las precauciones mencionadas... Escoger las muestras aleatoriamente a partir del material a granel o los envases disponibles de la preparación. Para obtener la cantidad requerida, mezclar los contenidos de un número suficiente de envases para proporcionar la muestra.”* Por lo tanto, para representar la muestra, lo más adecuado es utilizar una cantidad suficiente de muestras escogidas aleatoriamente para mezclarlas y analizarlas como un solo análisis, mas no realizar 3 análisis individualmente. Lo anterior se muestra gráficamente en la siguiente figura:

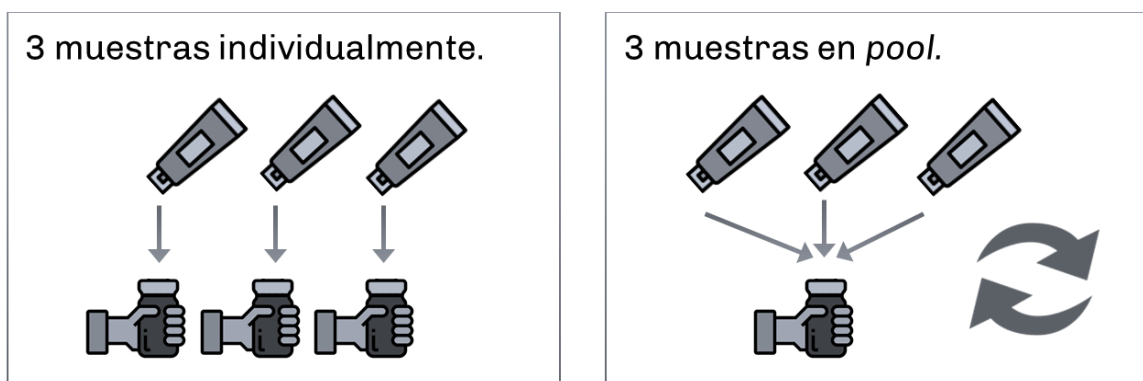


Figura 21. Cambio generado en la prueba de recuento microbiano en el paso de pesada, de análisis individual (imagen de la izquierda) a muestreo en *pool* (derecha).

A partir de lo anterior, se procedió a modificar y realizar los cambios con respecto al instructivo actual y cambiando tales puntos.

Al analizar los 4 productos con 3 lotes cada producto como se observa en la Tabla 31, se procedió a analizar los datos en las fechas mencionadas en la Tabla 32 con los medios de cultivo elaborados en las secciones anteriores. En la tabla 33 muestra el crecimiento de 1 UFC al realizar la primera corrida de los 4 productos, esto se debe a las contaminaciones debido al personal, por lo que, si el resultado de los productos sale contaminado, habrá que realizar debida investigación para identificar si el microorganismo es proveniente al mal manejo por el personal o es inherente al producto. Empero se puede notar en la Tabla 34 que el crecimiento es de 0 UFC/placa y este resultado concuerda con los resultados obtenidos (no se muestran en los resultados debido a que es información confidencial de los productos).

Ahora bien, si se cambia estos 2 aspectos puede implicar cambios grandes dentro del laboratorio, debido a que, en lugar de realizar 3 análisis de muestras, se realiza un solo análisis de Recuento con muestras representativas del lote, esto reduce los costos arraigados a este análisis hasta una tercera parte de lo que se gasta originalmente. Además, libera 2/3 partes de la carga de trabajo y el gasto de personal innecesario o que bien se puede asignar otras labores dentro de la Unidad.

Por ejemplo, dentro del laboratorio se prepara semanalmente 2 lotes de medios de cultivo de 9 L de caldo tripticasa para el recuento microbiano y esto para suplementar el recuento 3 veces a la semana y cada vez se realizan pruebas a 9 lotes de productos farmacéuticos y en un mes se estaría elaborando 72 Litros mensualmente. Si se implementa el método actualizado, se estaría elaborando 24 Litros mensualmente para examinar 27 lotes de medicamentos semanalmente. Por otro lado, si en lugar de examinar 3 veces semanalmente se realiza sólo 1 vez por semana, se estaría ahorrando dos días laborales o dos días hombre.

Pero ¿Cuál sería la labor de los técnicos en lugar de realizar el recuento microbiano? La respuesta sería realizar las pruebas de Microorganismos Específicos en el tiempo correspondiente, ya que, si se realizara un recuento microbiano un viernes, la prueba de microorganismos específicos, según tiempos establecidos para la incubación de los medios es de 18-24 horas, por lo que si se requiere del examen de microorganismos específicos se necesita realizar el muestreo nuevamente el lunes siguiente, ya que esta ha pasado ya 72 horas desde el inicio de incubación.

Verificación de la Aptitud del Método de Recuento Microbiano

Los resultados de la Tabla 34 pueden ser falsos negativos cuando los antimicrobianos de los productos inhiben el crecimiento de la muestra, por esa razón es importante realizar la verificación del método de recuento mediante la prueba de Aptitud del Método de Recuento Microbiano. De hecho, se puede notar en las tablas 35 hasta 38 representado en la Figura 18 que el factor R se encuentra dentro del factor 2 establecido según normativas internacionales y por Farmacopeas armonizadas involucradas.

En conclusión, es viable la utilización del método de recuento microbiano realizando los cambios implementados y actualizados para los 4 productos farmacéuticos; es decir, ungüento de ácido salicílico, crema de rosas, jarabe de clorfenamina y polvo de colestiramina.

CONCLUSIONES

1. Se logró identificar las buenas prácticas y recomendaciones internacionales para establecer un método estandarizado para la fabricación de los medios de cultivo utilizados en la prueba de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles en el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos.

2. El procedimiento de fabricación de medios de cultivo de Agar Tripticasa de Soya y Caldo Tripticasa de Soya con Polisorbato 80 se encuentran validados para su uso en todos los análisis de Recuento Microbiano de Productos Farmacéuticos No Estériles en el Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos, según los atributos de calidad críticos aceptables.
3. Teniendo procedimientos de fabricación de los medios validados, se podrá exentar de la Prueba de Promoción de Crecimiento por cada vez que se fabrica el medio y en cambio, puede realizar la prueba de promoción de crecimiento por cada entrada de lote de medio deshidratado.
4. El medio de cultivo ASD es apto para el crecimiento y recuento de hongos o levaduras como *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Sin embargo, no cumplen con el atributo de la acidez del medio, por lo que el procedimiento, actualmente, no está validado.
5. El período de validez de los medios de cultivo Agar Tripticasa de Soya y Caldo Tripticasa de Soya con Polisorbato 80 tienen un período de validez de 90 días, sea bajo condiciones de almacenamiento normales o de refrigeración.
6. El medio de cultivo Agar Sabouraud Dextrosa cumplen con la prueba de esterilidad, promueven el crecimiento y permiten el recuento de hongos o levaduras como *Candida albicans* y *Aspergillus niger* hasta los 90 días, sea bajo condiciones de almacenamiento normales o de refrigeración.
7. La propuesta de actualización de la prueba de recuento microbiano se puede realizar y se encuentra detallado en el Anexo 4 del presente documento.
8. Es viable realizar la prueba de Recuento Microbiano actualizada para Productos Farmacéuticos No Estériles de: crema de rosas, ungüento de ácido salicílico, jarabe de clorfenamina y polvo de colestiramina, utilizando como medio de cultivo líquido el Caldo Tripticasa de Soya con Polisorbato 80 y analizando varias muestras en un solo análisis.
9. Al mejorar el procedimiento de Recuento Microbiano, se podrán reducir costos de análisis, de personal y de tiempos en análisis.

RECOMENDACIONES

En cuanto a la temática del pH del Agar Sabouraud Dextrosa, se puede manejar un rango más amplio para el pH de este medio de cultivo, debido a que el pH que favorece el crecimiento de los hongos y levaduras se encuentra cerca de 5, esta recomendación basada en que los resultados de la promoción de crecimiento dieron conformes y dentro de los límites (factor de 2 de recuperación).

Además, para asegurar que el pH no se debe al agua utilizada (a pesar de ser desionizada), medir el pH del agua antes de que se prepare el medio de cultivo. Si este se encuentra muy ácido, ajustarlo con solución de NaOH y si está muy básica, acidificar con solución diluida de HCl. (21)

En un futuro, para efectos de comparación de factores de recuperación de los medios de cultivo sólidos, se recomienda alguno de los siguientes métodos en lugar de tomar la cantidad de UFC de referencia (en este caso, los escritos en el frasco de OneStep™). (58)

- Examinar 3 lotes de medios y comparar los resultados. Cada uno de los lotes deben plaquearse al menos por duplicado. Todos los resultados deben estar acordes con las características macroscópicas y los resultados de los 3 lotes deben estar dentro del factor de 2 entre ellos.
- Examinar el medio contra otra marca de medios listos-para-usar de un fabricante de amplia reputación. Los medios deben examinarse en paralelo y deben tener la misma formulación.

En casos como el *Pseudomonas aeruginosa*, puede verse afectado el conteo de microorganismos debido al tamaño pequeño de la colonia, por lo que se recomienda siempre usar el contador de colonias y con ayuda de la lupa. Por otro lado, los proveedores de los microorganismos describen que el conteo por vertido en placa es menor que por extensión en superficie y para favorecer la extensión homogénea se recomienda utilizar escobillos estériles o la tecnología *Spiral Plate Count Method*, utilizada por el proveedor actual para el recuento de la prueba de Promoción de Crecimiento. (59)

REFERENCIAS

1. LNCM-MC-001-6. Manual de Calidad del Laboratorio de Normas y Calidad de Medicamentos. Versión 6. [Documento Digital] Alajuela: LNCM; 2018
2. Laboratorio de Ensayo Acreditado – N° LE-127 [Internet]. Eca.or.cr. 2015 [cited 14 June 2019]. Available from: <http://www.eca.or.cr/docus/v2/4725>
3. Trabajos Finales de Graduación | Farmacia [Internet]. Farmacia.ucr.ac.cr. [cited 3 July 2019]. Available from: <http://farmacia.ucr.ac.cr/node/312>
4. Berry I. Good Manufacturing Practices (GMPs): An Overview. Informa Healthcare USA. 2007:1941-1947.
5. LNCM-IT-071-2. Preparación de Medios de Cultivo. Versión 2. [Documento Digital] Alajuela: LNCM; 2016.
6. Wickham Laboratories. Method suitability in microbiology: understanding complex cGMP guidelines. European Pharmaceutical Review [Internet]. 2016 [cited 14 May 2019];21(3):45. Available from: <https://wickhamlabs.co.uk/wp-content/uploads/2016/09/Method-Suitability-EPR-Application-Note.pdf>
7. <61> Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano. The Pharmacopoeia of United States of America USP41. 41st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2018.
8. Olivas E, Alarcón L. Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Ciudad Juárez, Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; 2001.
9. Rao S. Bacterial culture media [Internet]. Microrao.com. [cited 2 June 2019]. Available from: https://www.microrao.com/micronotes/culture_media.pdf
10. Rouf A, Kanojia V, Naik H, Naseer B, Qadri T. An overview of microbial cell culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry [Internet]. 2017 [cited 2 June 2019];6(6):1923-1928. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/20f9/9578ec89df81732ffa0f56e7aada64d4a404.pdf>
11. BD Tryptic Soy Agar [Internet]. Bd.com. 2003 [cited 2 June 2019]. Available from: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-256665.pdf>

12. Red PARF Documento Técnico N° 11. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica [Internet]. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica. 2013 [cited 3 May 2019]. Available from: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/Red-PARF-No11Es.pdf>
13. BBL Sabouraud Dextrose Agar y BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol [Internet]. Bd.com. 2015 [cited 2 June 2019]. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22894>
14. TRYPTIC SOY BROTH (7164) [Internet]. Foodsafety Neogen. 2017 [cited 15 June 2019]. Available from: https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7164_pi.pdf
15. Aseguramiento de calidad: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS [Internet]. Fao.org. [cited 11 June 2019]. Available from: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/aseg3.pdf
16. Cerra H, Fernández M, Horak C, Lagomarsino M, Torno G, Zarankin E. Manual De Microbiología Aplicada A Las Industrias Farmacéutica, Cosmética Y De Productos Médicos. Buenos Aires, Argentina: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC); 2013.
17. Waterworth P. The action of light on culture media. *Journal of Clinical Pathology*. 1969;22(3):273-277.
18. Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). 1st ed. Nueva York: Organización de las Naciones Unidas; 2005.
19. Vargas Flores T, Leydi Geovana V. Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga* [Internet]. 2014 [cited 21 April 2019]; 44:2309-2313. Available from: <http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v44/v44a02.pdf>

20. <1117> Óptimas Prácticas de Laboratorio Microbiológico. The Pharmacopoeia of United States of America USP41. 41st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2018.
21. ISO 11134:2014/A1:2018 Microbiology of food, animal feedingstuffs and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media [Internet]. Irish Standard. 2018 [cited 14 May 2019]. Available from: <https://infostore.saiglobal.com/preview/is/en/2014/i.s.eniso11133-2014%2Ba1-2018.pdf?sku=1734447>
22. Stanier R, Ingraham J, Wheelis M, Painter P. Microbiología. 2nd ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2005.
23. Gutiérrez de Gamboa S. Trabajo Práctico N° 8 ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO [Internet]. Ucv.ve. 2008 [cited 11 July 2019]. Available from: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Esterilizaci%C3%B3n_por_calor_h%C3%BAmedo.pdf
24. Garay E, Aznar R, Lalucat J, Ribas F. INFORME TÉCNICO SOBRE CEPAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO [Internet]. Uv.es. 2006 [cited 8 June 2019]. Available from: https://www.uv.es/cect2/65_Informe_Cepas_Trabajo
25. Berns K, Bond E, Manning F. Resource Sharing in Biomedical Research. Washington DC: National Academies Press (US); 1996.
26. About Us [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 May 2019]. Available from: <https://www.microbiologics.com/aboutus>
27. Gebrauchsanweisung [Internet]. Microbiologics.com. 2014 [cited 21 May 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=126129&c=915960&h=49c22526480db8eff192&_xt=.pdf
28. Product Sheet: Staphylococcus aureus subsp. aureus (ATCC® 6538™) [Internet]. Atcc.org. 2019 [cited 21 April 2019]. Available from: <https://www.atcc.org/~ps/6538.ashx>
29. Product Sheet: Pseudomonas aeruginosa (ATCC® 9027™) [Internet]. Atcc.org. 2019 [cited 21 April 2019]. Available from: <https://www.atcc.org/~ps/9027.ashx>

30. Product Sheet: *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii* (ATCC® 6633™) [Internet]. Atcc.org. 2019 [cited 21 April 2019]. Available from: <https://www.atcc.org/~ps/6633.ashx>
31. Product Sheet: *Candida albicans* Serotipo A (ATCC® 10231™) [Internet]. Atcc.org. 2019 [cited 21 April 2019]. Available from: <https://www.atcc.org/~ps/10231.ashx>
32. Product Sheet: *Aspergillus brasiliensis* o *Aspergillus niger* (ATCC® 16404™) [Internet]. Atcc.org. 2019 [cited 21 April 2019]. Available from: <https://www.atcc.org/~ps/16404.ashx>
33. Keyur B A, Khushboo D S, Sushma P Y, Hetal S P, Chetan B P. Overview of Validation and Basic Concepts of Process Validation. *Scholars Academic Journal of Pharmacy* [Internet]. 2014 [cited 21 May 2019];3(2):178-190. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/974b/f78fed920857276ceaff39948d24a36fb00e.pdf>
34. Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations Report N°53. World Health. Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Italy: World Health Organization; 2019.
35. Booth C. How To Establish Growth Promotion Tests For Pharmaceutical Culture Media [Internet]. *Pharmaceuticalonline.com*. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/how-to-establish-growth-promotion-tests-for-pharmaceutical-culture-media-0001>
36. Guidelines for Assuring Quality of Medical Microbiological Culture Media [Internet]. *Theasm.org.au*. 2012 [cited 21 May 2019]. Available from: <https://www.theasm.org.au/assets/ASM-Society/Guidelines-for-the-Quality-Assurance-of-Medical-Microbiological-culture-media-2nd-edition-July-2012.pdf>
37. Sistema Costarricense de Información Jurídica. Publica resolución N° 256-2010 (COMIECO-LIX) Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.01.04:10 Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para uso Humano. San Salvador: MINECO, CONACYT, MIFIC, SIC y MEIC; 2011. Available from:

http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=70606&nValor3=85364&strTipM=TC

38. Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests General Chapter: ICH [Internet]. Ich.org. 2010 [cited 21 May 2019]. Available from: <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/microbiological-examination-of-non-sterile-products-microbial-enumeration-tests-general-chapter.html>
39. <61> Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano. The Pharmacopoeia of United States of America USP31. 31st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2008.
40. <61> Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano. The Pharmacopoeia of United States of America USP32. 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2009.
41. <1151> PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS. The Pharmacopoeia of United States of America USP41. 41st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2018.
42. <1111> Microbiological examination of nonsterile products. The Pharmacopoeia of United States of America USP41. 41st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2018.
43. <2> ORAL DRUG PRODUCTS. The Pharmacopoeia of United States of America USP41. 41st ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2018.
44. Allorto N, Atieh B, Bolgiani A, Chatterjee P, Cioffi W, Dziewulski P et al. ISBI Practice Guidelines for Burn Care, Part 2. Burns. 2018;44(7):1617-1706.
45. Shamsollahi H, Ghoochani M, Jaafari J, Moosavi A, Sillanpää M, Alimohammadi M. Environmental exposure to endotoxin and its health outcomes: A systematic review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2019; 174:236-244.
46. Slikker W, de Souza Lima T, Archella D, de Silva J, Barton-Maclaren T, Bo L et al. Emerging technologies for food and drug safety. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2018; 98:115-128.

47. Nie Y, Luo F, Lin Q. Dietary nutrition and gut microflora: A promising target for treating diseases. *Trends in Food Science & Technology*. 2018; 75:72-80.
48. Xiao S, Venkateswaran K, Jiang S. The risk of *Staphylococcus* skin infection during space travel and mitigation strategies. *Microbial Risk Analysis*. 2019; 11:23-30.
49. Corredor Y, Mercado M, Pérez G, Campos C. Incidencia de microorganismos mesófilos en la producción del agua de bebida envasada. *Biomédica* [Internet]. 1994 [cited 21 May 2019]; 14:140-145. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/2097/2131/>
50. Tortora G, Funke B, Case C. *Introducción a la microbiología*. 9th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
51. Alonso Nore L, Poveda Sánchez J. Estudio Comparativo en Técnicas de Recuento Rápido en el Mercado y Placas Petrifilm 3M para Análisis de Alimentos [Licenciatura]. Universidad Javeriana; 2008. Available from: <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>
52. MGA 0571. LÍMITES MICROBIANOS [Internet]. *Farmacopea.org.mx*. [cited 21 June 2019]. Available from: <https://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/146.pdf>
53. Sutton S, Singer D. Microbiological Best Laboratory Practices, USP <1117> Value and Recent Changes to a Guidance of Quality Laboratory Practices [Internet]. *Microbiologynetwork.com*. 2011 [cited 21 June 2019]. Available from: http://www.microbiologynetwork.com/content/file/APR_May2011_Microbiological_Best_Laboratory_Practices_USP_1117.pdf
54. Hashim I. *Microbiological Culture Media in Pharmaceutical Industry*. Egypt: OMICS Group; 2019.
55. Najafpour G. Sterilization. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. 2015:435-452. Doi: 10.1016/B978-0-444-63357-6.00015-8
56. Bhatt V. *GMP compliance, productivity, and quality*. Buffalo Grove, Ill.: Interpharm Press; 1998.
57. Moya A, Joó L, Rodríguez A, Hernández J, Hernández J, Almenares J et al. Preparado de inmunoglobulina contra LPS de *Pseudomonas aeruginosa*

serotipo O11. VacciMonitor [Internet]. 2002 [cited 21 June 2019];11(1):11-17.
Available from: <http://www.bvv.sld.cu/vaccimonitor/vm2002/a3.pdf>

58. Growth Promotion Test Guide for Media Used in Microbial Enumeration Tests [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=112648&c=915960&h=8579ada88ed54d45a6a8&_xt=.pdf

59. Pour Plate Method: Best Practices [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=152064&c=915960&h=888f62b39f5442414ec9&_xt=.pdf

ANEXO 1

PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

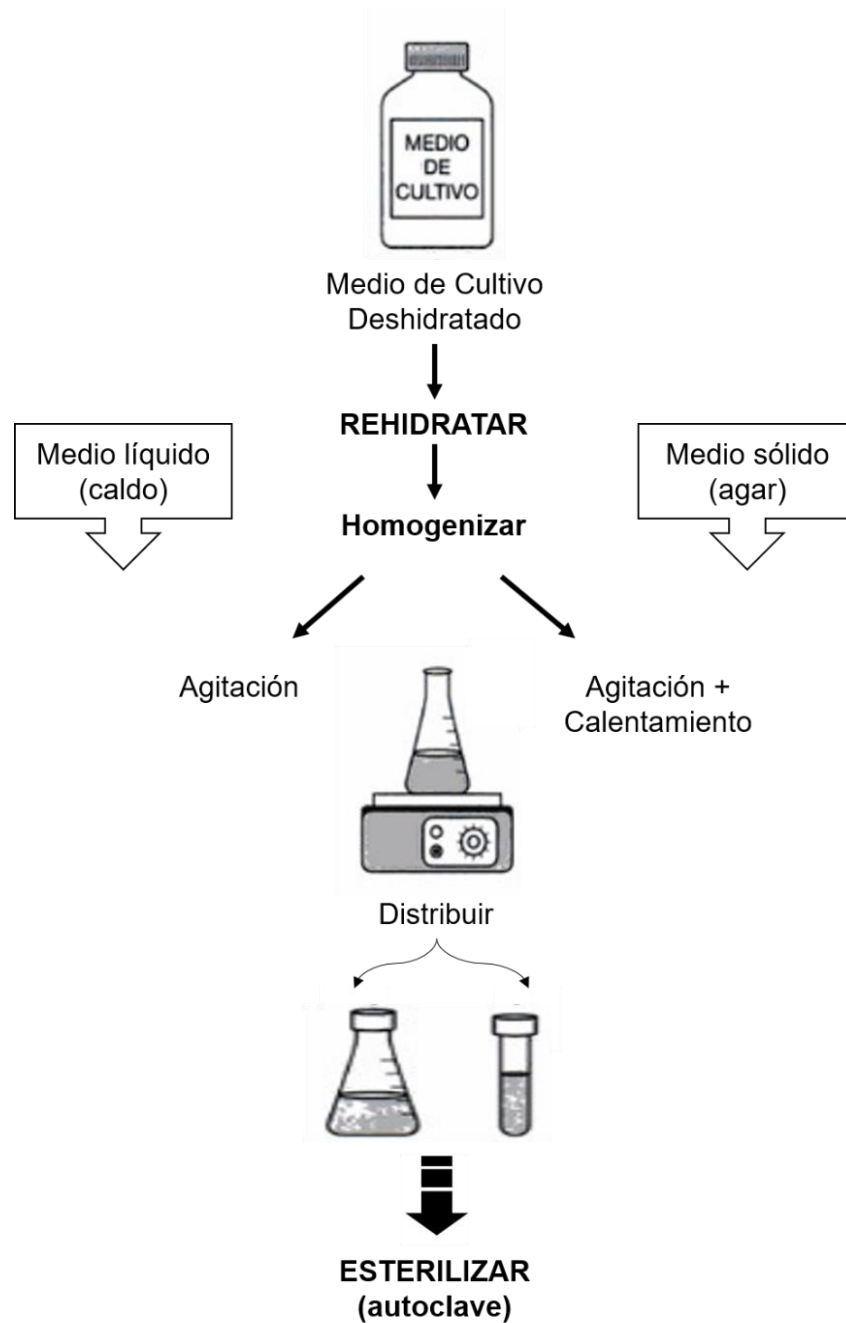


Figura A1. Procedimiento General de Preparación de Medios de Cultivo

Fuente: Gamazo de la Rasilla C, Díaz R, López-Goñi I. Manual práctico de microbiología. 3rd ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2010.

Tabla A1. Esquema de Procedimiento de los medios de cultivo a preparar.

Medio de Cultivo	1. Peso (g/L)	2. Aditivo	3. Volumen (mL)	3. pH	4. Hervir	5. Envasado (mL)	6. Autoclavar	7. Apariencia
ATS	200,0		5.000	7,3 ± 0.2	✓	200	✓	Café-amarillento.
ASD	325,0		5.000	5,6 ± 0.2	✓	200	✓	Amarillo.
CTS80	270,0	1 mL/L Tween-80	9.000	7,3 ± 0.2		90	✓	Amarillo-beige.
CTS80	600,0	1 mL/L Tween-80	20.000	7,3 ± 0.2		90	✓	Amarillo-beige.

Fuente: Elaboración propia a partir de especificaciones farmacopeicas, normativas internacionales y recomendaciones de diversos autores.

En resumen, se toma en cuenta los aspectos generales de la Tabla A1 y los insumos disponibles dentro del laboratorio, se sigue el siguiente procedimiento

1. Antes de la preparación

1. Medir el pH del agua purificada, esta debe estar en un pH neutro entre 5,5 – 7,5.
2. Enjuagar toda la cristalería antes de usarla para eliminar cualquier sustancia traza, especialmente los detergentes.
3. Los medios de cultivo deshidratados deben almacenarse a una temperatura entre 15-25°C.
4. El operador debe tener en cuenta la vestimenta de protección: cubrebocas, gabacha y gorro de laboratorio.

2. Preparación de los medios líquidos

1. Pesar la cantidad adecuada de medio deshidratado (especificada en Tabla A1) de manera rápida y precisa, evitar crear polvo y no inhalar el polvo. Cerrar el recipiente lo antes posible para evitar la contaminación. Registrar el dato en el registro de la Figura A2.
2. Transferir el medio deshidratado del recipiente de pesaje en un recipiente de 1-2 L temporalmente (**Recipiente A**) para suspender el polvo.
3. Para rehidratar el medio, medir el volumen de agua destilada con probeta Clase A. Agregar al volumen de agua especificado, en lugar de compensar ese volumen. Es decir, si son 270 g por Litro de agua, agregar 1000 mL medidos con probeta y que no sea c.s.p. 1000 mL.
4. **Recipiente A.** Agregar poco a poco la mitad del volumen establecido de agua (mientras se agita con pastilla magnética vigorosamente en el recipiente de 1-2 L) suficiente para suspender el polvo completamente, sin quedar aglomerados de masa.
5. Al inicio se pueden observar grumos y espuma, por lo que se debe agitar hasta disminuirse los grumos.
6. Inmediatamente, adicionar en el **Recipiente A** un volumen de aproximadamente 1 mL de Polisorbato 80 por litro de medio de cultivo a preparar. Por ejemplo, para el lote de 9 litros de CTS80 adicionar 9 mL de Tween 80. No se debe detener el agitador magnético.
7. Sin detener el agitador magnético. Calentar ligeramente el **Recipiente A** hasta que el medio de cultivo quede homogéneo y el polisorbato se encuentre totalmente disuelto. No es necesario hervir.
8. **Recipiente B.** Recipiente metálico (de capacidad de 9 litros o 20 litros) de capacidad de volumen suficiente para contener el volumen a preparar.
9. Mezclar el volumen contenido del **Recipiente A** con el resto de agua en el recipiente metálico **B**.
10. Agitar con pastilla magnética o con policía hasta quedar solución homogénea y completamente translúcida.

11. Medir el pH del medio a temperatura ambiente. Usualmente, el pH del medio ya se encuentra dentro de los rangos establecidos en la Tabla A1, pero puede necesitar ajustes de pH, sin embargo, evitar los ajustes excesivos del pH porque esto puede alterar la composición química del medio. El pH tiende a caer aproximadamente 0,2 unidades después de la esterilización por vapor.
12. Trasvasar en los frascos de vidrio ámbar autoclavables (volumen según Tabla A1). Para facilitar la distribución de volúmenes, puede usarse el dispensador de medios. Tomar en cuenta un exceso de volumen debido a que los medios líquidos disminuyen el volumen después del proceso de esterilización, por tal razón, ajustar el dispensador de medios a 97-98 mL.
13. Cerrar bien los frascos
14. Con una etiquetadora de precios, rotular los envases de medio de cultivo con las siglas del medio de cultivo respectivo y la fecha de preparación:

CTS80 ddmmaa

15. Antes de esterilizar los medios, asegurarse de que la autoclave se testeó con la prueba de Bowie-Dick previamente.
16. Ciclo de Esterilización: Autoclavar a 121 °C por 15 minutos. Volúmenes de envasado mayores a 1000 mL podría requerir un tiempo prolongado de esterilización.
17. Al sacar los medios de la autoclave, permitir que los frascos lleguen a temperatura ambiente antes de almacenarlos.
18. Al terminar el ciclo de esterilización, medir el pH de 1 frasco de CTS80 cuando alcanza temperatura ambiente.
19. Almacenar los medios en la refrigeradora o en la bodega de almacenamiento, según corresponda.
20. Documentar todos los datos relevantes en el Registro Anexo 1 LNCM-IT-071-2 (Figura A2) de: código, número de lote, masa pesada, volumen usado en la preparación del lote, volumen de envasado, pH, datos de preparación, condiciones de esterilización y operador.

3. Preparación de los medios sólidos

1. Pesar la cantidad adecuada de medio deshidratado (especificada en Tabla A1) de manera rápida y precisa, evitar crear polvo y no inhalar el polvo. Cerrar el recipiente lo antes posible para evitar la contaminación. Registrar el dato en el registro de la Figura 1.
2. Transferir el medio deshidratado del recipiente de pesaje en un recipiente de 1-2 L temporalmente (**Recipiente A**) para suspender el polvo.
3. Para rehidratar el medio, medir el volumen de agua destilada con probeta Clase A. Agregar al volumen de agua especificado, en lugar de compensar ese volumen. Es decir, si son 270 g por Litro de agua, agregar 1000 mL medidos con probeta y que no sea c.s.p. 1000 mL.
4. **Recipiente A.** Agregar poco a poco la mitad del volumen establecido de agua (mientras se agita con pastilla magnética vigorosamente en el recipiente de 1-2 L) suficiente para suspender el polvo completamente, sin quedar aglomerados de masa.
5. Al inicio se pueden observar grumos y espuma, por lo que se debe agitar hasta disminuirse los grumos.
6. **Recipiente B.** Recipiente metálico (de capacidad de 9 litros) de capacidad de volumen suficiente para contener el volumen a preparar.
7. Mezclar el volumen contenido del **Recipiente A** con el resto de agua en el recipiente metálico **B**.
8. Agitar con pastilla magnética o con policía hasta quedar suspensión homogénea.
9. Medir el pH de la suspensión a temperatura ambiente. Usualmente, el pH del medio ya se encuentra dentro de los rangos establecidos en la Tabla A1, pero puede necesitar ajustes de pH, sin embargo, evitar los ajustes excesivos del pH porque esto puede alterar la composición química del medio. El pH tiende a caer aproximadamente 0,2 unidades después de la esterilización por vapor.
10. Mientras se agita la mezcla, calentar a máxima potencia para hervir el medio de cultivo sólido (ATS o ASD). Las soluciones con agar tienden a hervir

rápidamente, hervir la mezcla por 1 minuto. La solución queda transparente y burbujeante después de hervir. Utilizar guantes térmicos para el manejo de los recipientes.

11. Trasvasar en los frascos de vidrio autoclavables (volumen según Tabla A1).
12. Con una etiquetadora de precios, rotular los envases de medio de cultivo con las siglas del medio de cultivo respectivo y la fecha de preparación:

ATS	ASD
ddmmaa	ddmmaa

13. Antes de esterilizar los medios, asegurarse de que la autoclave se testeó con la prueba de Bowie-Dick previamente.
14. Ciclo de Esterilización: Autoclavar a 121 °C por 15 minutos. Volúmenes de envasado mayores a 1000 mL podría requerir un tiempo prolongado de esterilización. Antes de autoclavar, asegurarse de que las tapas de los frascos estén flojas, esto para que se pueda entrar el flujo de vapor estéril y se calienten correctamente los medios.
15. Al terminar el ciclo de esterilización, se extrae de manera aséptica un volumen pequeño (10 mL) en un recipiente. Al solidificarse y llega a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), se mide el pH.
16. A su vez, cuando termina el ciclo de esterilización, cerrar bien los frascos de vidrio y se dejan reposar hasta temperatura ambiente.
17. Almacenar los medios en la refrigeradora o en la bodega de almacenamiento, según corresponda.
18. Documentar todos los datos relevantes en el Registro Anexo 1 LNCM-IT-071-2 (Figura A2) de: código, número de lote, masa pesada, volumen usado en la preparación del lote, volumen de envasado, pH, datos de preparación, condiciones de esterilización y operador.


Registro de producción de nuevo lote de medio de cultivo ANEXO 1 LNCM-IT-071-2						Fecha de preparación:							
INFORMACIÓN GENERAL													
Medio de cultivo						Fecha de caducidad:							
Fecha de preparación						Volumen preparado:							
Material de envase:						Tamaño de lote							
<input type="checkbox"/> 50 mL <input type="checkbox"/> 100 mL <input type="checkbox"/> 200 mL <input type="checkbox"/> 250 mL						Metodología:		LNCM-IT-071-					
Analista													
INGREDIENTES UTILIZADOS													
<input type="checkbox"/>	Medio deshidratado	Marca <input type="checkbox"/> Becton <input type="checkbox"/> Liofilchem <input type="checkbox"/> Difco <input type="checkbox"/> Acumedia <input type="checkbox"/> otro	N° de lote:	Fecha de vencimiento:	Cantidad utilizada	Pegar registro de pesada							
<input type="checkbox"/>	Lecitina	Marca	N° de lote:	Fecha de vencimiento:	Cantidad utilizada	Pegar registro de pesada							
<input type="checkbox"/>	Glicerina	Marca	N° de lote:	Fecha de vencimiento:	Cantidad utilizada								
<input type="checkbox"/>	Polisorbato <input type="checkbox"/> 20 <input type="checkbox"/> 80	Marca	N° de lote:	Fecha de vencimiento:	Cantidad utilizada								
PROCESO DE ESTERILIZACIÓN													
Autoclave		<input type="checkbox"/> E 098 (Getinge 113LS) <input type="checkbox"/> E 097 (Getinge 533LS) <input type="checkbox"/> Otro: _____	Numero de ciclo de autoclave: _____		Pegar registro de autoclave								
Control con bioindicador		<input type="checkbox"/> Cumple <input type="checkbox"/> No cumple	Requerimientos: -Temperatura: _____ °C± _____ °C -Tiempo: _____ min										
PRUEBAS DE APTITUD DEL MEDIO PREPARADO		Registro #:											
PARAMETRO		ESPECIFICACIÓN		ENCONTRADO									
Descripción organoléptica				<input type="checkbox"/> Cumple <input type="checkbox"/> No cumple									
pH													
Esterilidad (Aplica únicamente a medios utilizados prueba de esterilidad)		A partir de su producción, el medio debe presentar ausencia de crecimiento (Turbidez) durante 14 días de incubación		<input type="checkbox"/> Cumple <input type="checkbox"/> No cumple <input type="checkbox"/> N/A									
DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8	DÍA 9	DÍA 10	DÍA 11	DÍA 12	DÍA 13	DÍA 14
Prueba de esterilidad: (-) Ausencia de crecimiento; (+) Crecimiento visible													
Aprobado por:						Fecha							

Figura A2. Tabla de registro de Preparación de Medios de Cultivo en LNCM. Fuente: Anexo 1 LNCM-IT-071-2 Registro de Producción de nuevo lote de medio de cultivo.

4. Utilización de los medios de cultivo post-almacenamiento

Para fundir el medio cultivo para su utilización utilizar un ciclo en autoclave de 15 min a 121°C de flujo de vapor y se debe evitar sobrecalentamiento y retirarse del calentamiento cuando se hayan derretido.

Inmediatamente, enfriar en un baño de agua termorregulado por al menos 1 hora para que este se atempere adecuadamente antes de usar y no esperar más de 4 horas para su uso y no utilizar el medio después de haberse resolidificado.

ANEXO 2

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Verificación de Equipos y Materiales

Tabla A2. Verificación de los equipos utilizados en el proceso de manufactura

Instrumento	Calibrado (Sí/No)	Fecha última de Calibración	Fecha de Vigencia
Balanza	Sí	02-Oct-18	30-Oct-19
pH-metro	Sí	18-Jun-18	30-Jun-19
Autoclave	Sí	13-Feb-18	30-Abr-19

Tabla A3. Verificación de la materia prima usada en el proceso de manufactura.

Medio deshidratado o reactivo	Fabricante	Lote	Vence	CoA Cumple (Sí/No)
Caldo Trypticasa Soya	Acumedia	111068A	31-Aug-22	Sí
Polisorbato 80	Neogen	110907	8-Nov-20	Sí
Agar Trypticasa Soya	Merck	VM 755858	19-Set-21	Sí
Agar Sabouraud Dextrosa	Difco	8227587	30-Jun-23	Sí

Tabla A4. Códigos de lote de manufactura de medios de cultivo utilizados para la validación.

Medio de Cultivo	Primer lote	Segundo Lote	Tercer Lote
CTS80	CTS80-120219	CTS80-200219	CTS80-110319
ATS	ATS-120219	ATS-200219	ATS-270219
ASD	ASD-120219	ASD-250219	ASD-270219

Especificaciones de calidad y criterios de aceptación

1. Caldo Tripticasa de Soya con Polisorbato 80.

Tabla A5. Especificaciones de calidad de las pruebas en CTS80.

Análisis	Especificaciones de Calidad
Antes de esterilización	
pH	7,3 ± 0,2
Inspección Visual	Amarillo-Beige. Ausencia de turbidez. Sin grumos.
Después de esterilización	
pH	7,3 ± 0,2
Inspección Visual	Amarillo-Beige. Ausencia de turbidez.
Promoción:	
<i>S. aureus</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
<i>P. aeruginosa</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
<i>B. subtilis</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
Control de contaminación	0 UFC

2. Agar Tripticasa Soya

Tabla A6. Especificaciones de calidad de las pruebas en ATS.

Análisis	Especificaciones de Calidad
Antes de esterilización	
pH	7,3 ± 0,2
Inspección Visual	Café-amarillento. Ausencia de turbidez después de hervir.
Después de esterilización	
pH	7,3 ± 0,2
Inspección Visual	Café-amarillento y Ausencia de turbidez justo después de autoclavar. Café-amarillento no translúcido después de solidificar.
Promoción:	
<i>S. aureus</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
<i>P. aeruginosa</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
<i>B. subtilis</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
<i>C. albicans</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
<i>A. niger</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
Control de contaminación	0 UFC

3. Agar Sabouraud Dextrosa

Tabla A7. Especificaciones de calidad de las pruebas en ASD.

Análisis	Especificaciones de Calidad
Antes de esterilización	
pH	5,6 ± 0,2
Inspección Visual	Amarillo. Ausencia de turbidez después de hervir.
Después de esterilización	
pH	5,6 ± 0,2
Inspección Visual	Amarillo y ausencia de turbidez justo después de autoclavar. Amarillo no translúcido después de solidificar
Promoción: <i>C. albicans</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
<i>A. niger</i>	50% ≤ Factor R ≤ 200%
Control de contaminación	0 UFC

Pruebas de Atributos de Calidad de Medios de Cultivo

1. Inspección visual de los atributos de calidad

Antes de realizar la prueba de Promoción de Crecimiento, se realiza una inspección visual, tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- Cambios de color.
- Signos de evaporación/deshidratación.

Debido a que las características anteriores son subjetivas, no se debe basar en la apariencia del medio para determinar la estabilidad del medio.

2. Acidez del medio de cultivo

Verificar que el ajuste del pH-metro se realiza con soluciones buffer vigentes y que cumplen con las especificaciones de calidad.

2.1. Procedimiento de medición de pH

Seguir el procedimiento descrito en el LNCM-IT-028-3 para el ajuste del equipo, luego:

- Sumergir el sensor de temperatura y el electrodo de pH en el medio de cultivo. Asegurarse que el nivel del líquido a medir sea superior al diafragma del electrodo de pH.
- Leer en la pantalla el valor de pH de la muestra cuando se estabilice.
- Pulsar [MODE] para visualizar en la pantalla el valor de temperatura o pH, según se requiera.
- Pulsar [CAL DATA] en el número 7 para observar los datos de ajuste.

2.2. Especificaciones y criterios de aceptación

Para el registro de datos, es sumamente importante el anotar los datos de temperatura de medición a la hora de realizar las mediciones, ya que el pH es dependiente de la temperatura.

Tabla A8. Criterios de aceptación para la prueba de pH.

Medio de Cultivo	Especificaciones
CTS80	7,1 – 7,5
ATS	7,1 – 7,5
ASD	7,4 – 5,6

3. Prueba de Promoción de los Medios de Cultivo

La promoción de crecimiento de los microorganismos es específico para cada medio de cultivo.

3.1. Requisitos de la Prueba⁴

1. Inocular en el medio con menos o igual que 100 UFC del microorganismo correspondiente.
2. Utilizar las cepas microbiológicas recomendadas por las farmacopeas. Las cepas deben ser no más de 5 pasajes a partir del cultivo de referencia.
3. Testear cada medio con un solo microorganismo a la vez.
4. Testear por duplicado.

En la siguiente tabla se muestran las cepas utilizadas para la promoción de los medios de cultivo no selectivos mencionados anteriormente:

Tabla A9. Cepas de referencia en la Promoción de Crecimiento de Medios de Cultivo.

Medio de Cultivo	Microorganismos*	ATCC	Temperatura de incubación (°C)
CTS80	<i>S. aureus</i>	6538	30 – 35
	<i>P. aeruginosa</i>	9027	30 – 35
	<i>B. subtilis</i>	6633	30 – 35
	Control Negativo	-	30 – 35
ATS	<i>S. aureus</i>	6538	30 – 35
	<i>P. aeruginosa</i>	9027	30 – 35
	<i>B. subtilis</i>	6633	30 – 35
	<i>C. albicans</i>	10231	30 – 35
	<i>A. niger</i>	16404	30 – 35
	Control Negativo	-	30 – 35
ASD	<i>C. albicans</i>	10231	20 – 25
	<i>A. niger</i>	16404	20 – 25
	Control Negativo	-	20 – 25

⁴ Growth Promotion Test Guide for Media Used in Microbial Enumeration Tests [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=112648&c=915960&h=8579ada88ed54d45a6a8&_xt=.pdf

*Agregar una cantidad menor o igual a 100 UFC de los microorganismos correspondientes en un volumen de 100 μ L.

3.2. Preparación de las Cepas Microbiológicas

Para el manejo de las cepas mencionadas anteriormente, se sigue el siguiente procedimiento para cada cepa según Microbiologics®⁵:

1. La refrigeración de los gránulos o pellets liofilizados se almacenaron entre 2°C y 8°C.
2. Se verificó la fecha de vencimiento de los pellets y los fluidos de hidratación.
3. El vial con los pellets se retiró de la refrigeración y se ajustó a la temperatura ambiente antes de la apertura del frasco (aproximadamente 30 minutos).
4. Mientras se ajusta a temperatura ambiente, se calentó el fluido de hidratación (al menos 30 minutos) a 34-38°C en una incubadora ajustada a 36°C.
5. En una cámara de flujo laminar (CFL), se agregó 2 pellets tomadas con pinzas estériles al vial de 2 mL de fluido de hidratación. No se debe retirar el desecante del vial. Los 2 gránulos en la solución se utilizan para obtener una concentración de 10-100 ufc por cada 0.1 mL en medios no selectivos.
6. Inmediatamente, se cerró el vial de pellets y se volvió a colocar el vial en refrigeración de 2-8°C.
7. Inmediatamente, se cerró el vial del material hidratado y se colocó en una incubadora a 34-38°C nuevamente (sin agitar) durante 30 minutos para asegurar la hidratación completa.
8. Justo después de la incubación, se agitó en vórtex el material hidratado hasta que los gránulos estén completamente disueltos y se tenga una suspensión homogénea.

⁵ GEBRAUCHSANWEISUNG [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=126129&c=915960&h=49c22526480db8eff192&_xt=.pdf

9. Para la prueba de Promoción o Aptitud, se agregó -con una micropipeta estéril- 0,1 mL de suspensión hidratada al material que se necesite analizar. La suspensión restante se puede refrigerar (2-8°C) y usar durante 8 horas (sin requerir tiempo de calentamiento).
10. Después del uso, se elimina según especificaciones del laboratorio para el manejo de desechos.

3.3. Control Negativo

Para el CTS80, se considera como Control Negativo un frasco de caldo a la cual no se le adiciona ninguna cepa microbiológica, mostrando como ausencia de microorganismos por medio de ausencia de turbidez.

En caso de ATS o ASD, se considera como Control Negativo dos placas del agar a las cuales no se le adiciona ninguna cepa microbiológica, mostrando ausencia de contaminación.

3.4. Control Ambiental

Cada vez que se realiza una prueba de Promoción de Crecimiento, se debe colocar una placa de ATS y otra de ASD puestas en el área de trabajo mientras se está realizando el análisis, para verificar la contaminación ambiental del área y si se haya alguna contaminación, poder identificarla y descartar las probabilidades de que los microorganismos que crecen no son provenientes del ambiente.

3.5. Promoción de Crecimiento del Caldo Trypticase de Soya con Tween 80 (CTS80)

1. Tomar 4 Frascos del Lote de Producción de CTS80 de 90 mL (uno para cada cepa según Tabla M y otro para el control) de cada lote de producción.
2. Permitir que los medios se atemperen al medio ambiente de análisis (esperar al menos 30 minutos)
3. Rotularlos de manera apropiada con la siguiente codificación.

<p>Promoción</p> <p>Medio-Cond.almac.-No.Lote</p> <p><i>Cepa microbiológica</i></p> <p>Fecha de análisis: dd.mm.aaaa</p>

Ejemplos:

<p>Promoción</p> <p>CTS80-TA-01</p> <p><i>S.aureus</i></p> <p>Fecha: 04.03.2019</p>	<p>Promoción</p> <p>ATS-Ref-02</p> <p><i>P.aeruginosa</i></p> <p>Fecha: 04.03.2019</p>	<p>Promoción</p> <p>ASD-TA-03</p> <p><i>A.niger</i></p> <p>Fecha: 04.03.2019</p>
--	---	---

Figura A3. Ejemplos de etiquetas de Promoción de Medios de Cultivo.

4. Trabajar en una cámara de flujo laminar (CFL).
5. A los frascos, antes de ingresar en la CFL, se echa Alcohol 70% en la superficie de los frascos y se limpian con una mantilla estéril.
6. Abrir el frasco, inocular con una cantidad menos de 100 UFC de los microorganismos respectivos a cada frasco (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*), equivalente a 0,1 mL (con micropipeta) como se describe en la sección de 'Preparación de Cepas'.
7. Al frasco **Control**, se abre y se cierra el frasco nuevamente.
8. Incubar los frascos a una temperatura de 30-35°C por menos de 3 días.
9. Realizar con 3 lotes de Producción.

3.6. Promoción de Crecimiento del Agar Trypticase de Soya (ATS)

1. Tomar 2 Frascos del Lote de Producción de ATS de 200 mL del lugar de almacenamiento. Dos frascos para obtener un volumen suficiente para dos placas por cada una de las cepas a utilizar según Tabla M (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. niger*) y otras 2 placas para el control.
2. Fundir los frascos de medio preparado y después de derretir los medios, debe esperarse dos minutos en una superficie resistente al calor y luego colocar en un baño maría con termostato hasta alcanzar 42-45°C.

3. Rotular las placas de manera apropiada (2 placas de cada cepa y 2 placas del Control) de la misma manera señalada en la Figura A3 de la sección anterior.
4. Trabajar en una cámara de flujo laminar (CFL).
5. A las placas vacías, después de ingresar en la CFL, se cierra y se enciende la luz UV.
6. Inocular con una cantidad menos de 100 UFC de los microorganismos respectivos a cada placa (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. niger*), equivalente a 0,1 mL (con micropipeta) como se describe en la sección de 'Preparación de Cepas'.
7. Al frasco de ATS, se echa Alcohol 70% en la superficie de los frascos y se limpian con una mantilla estéril.
8. Verter una cantidad aproximada entre 15-20 mL de ATS a cada placa.
9. Realizar movimientos ligeros circulares con direcciones alternativas como se muestra en la Figura H para asegurar que los microorganismos agregados se distribuyen homogéneamente en el medio.

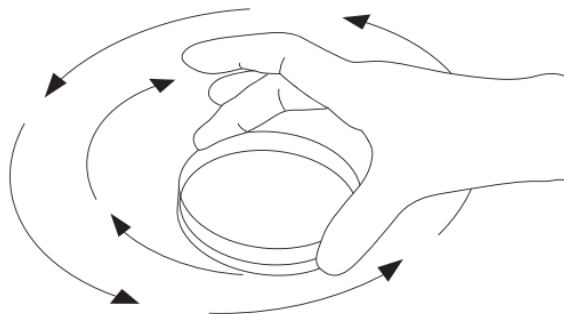


Figura A4. Movimientos circulares ligeros en el método vertido en placa.

Fuente: 2. Pour Plate Method: Best Practices [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=152064&c=915960&h=888f62b39f5442414ec9&_xt=.pdf

10. A las placas **Control** no se adicionan microorganismos y se realiza pasos **8** y **9**.
11. Permitir que las placas de agar solidifiquen.

12. Incubar las placas en posición invertida a una temperatura de 30-35°C por menos de 3 días para las bacterias y menos de 5 días para hongos y levaduras.
13. Realizar con 3 Lotes de Producción.

3.7. Promoción de Crecimiento del Agar Sabouraud Dextrosa (ASD)

1. Tomar 2 Frascos del Lote de Producción de ASD de 200 mL del lugar de almacenamiento. Dos frascos para obtener un volumen suficiente para dos placas por cada una de las cepas a utilizar según Tabla M (*C. albicans* y *A. niger*) y otras 2 placas para el control.
2. Fundir los frascos de medio preparado y después de derretir los medios, debe esperarse dos minutos en una superficie resistente al calor y luego colocar en un baño maría con termostato hasta alcanzar 42-45°C.
3. Rotular las placas de manera apropiada (2 placas de cada cepa y 2 placas del Control) de la misma manera señalada en la Figura A3.
4. Trabajar en una cámara de flujo laminar (CFL).
5. A las placas vacías, después de ingresar en la CFL, se cierra y se enciende la luz UV.
6. Inocular con una cantidad menos de 100 UFC de los microorganismos respectivos a cada placa (*C. albicans* y *A. niger*), equivalente a 0,1 mL (con micropipeta) como se describe en la sección de 'Preparación de Cepas'.
7. Al frasco de ASD, se echa Alcohol 70% en la superficie de los frascos y se limpian con una mantilla estéril.
8. Verter una cantidad aproximada entre 15-20 mL de ASD a cada placa.
9. Realizar movimientos ligeros circulares con direcciones alternativas como se muestra en la Figura A4.
10. A las placas **Control** no se adicionan microorganismos y se realiza pasos **8** y **9**.
11. Permitir que las placas de agar solidifiquen.
12. Incubar las placas en posición invertida a una temperatura de 20-25°C por menos de 5 días

13. Realizar con 3 Lotes de Producción.

3.8. Cálculo del factor R y Registros de datos

1. Calcular el factor UFC a partir de la cantidad de UFC recuperados por placa de la siguiente manera:

$$\text{Factor R (\%)} = \frac{\text{Promedio (UFC/placa)}}{\text{Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC/0,1 mL)}} * 100$$

2. Registrar los datos correspondientes de UFC obtenidos de las placas duplicadas, en las hojas de Promoción de Medios de Cultivo cada vez que se realiza la prueba.
3. Registrar los datos de factor R para la evaluación de la estabilidad de los medio y poder realizar comparaciones entre cepas.

4. Criterios de Aceptación

La siguiente tabla muestran los criterios de aceptación de la inspección visual de atributos de calidad, la acidez del medio de cultivo y la prueba de promoción de crecimiento de los medios de cultivo para la prueba de recuento microbiano.^{6 7}

6 Growth Promotion Test Guide for Media Used in Tests for Specified Microorganisms [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=112650&c=915960&h=71cacf33220c16bd916f&_xt=.pdf

7 Growth Promotion Test Guide for Media Used in Microbial Enumeration Tests [Internet]. Microbiologics.com. 2019 [cited 21 June 2019]. Available from: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=112648&c=915960&h=8579ada88ed54d45a6a8&_xt=.pdf

Tabla A10. Criterios de Aceptación de la Prueba de Promoción de Medios.

Medio de cultivo	Atributo de Calidad	Especificaciones
CTS80	pH	7,1 – 7,5
	Apariencia antes de la prueba:	No turbidez
	Promoción: <i>S. aureus</i>	Turbidez
	<i>P. aeruginosa</i>	Turbidez
	<i>B. subtilis</i>	Turbidez
	Control Negativo	No turbidez
	Control ambiental	< 10 UFC/placa.
ATS	pH	7,1 – 7,5
	Apariencia antes de la prueba	Café-amarillento opalescente.
	Promoción: <i>S. aureus</i>	$50\% \leq R \leq 200\%$
	<i>P. aeruginosa</i>	$50\% \leq R \leq 200\%$
	<i>B. subtilis</i>	$50\% \leq R \leq 200\%$
	<i>C. albicans</i>	$50\% \leq R \leq 200\%$
	<i>A. niger</i>	$50\% \leq R \leq 200\%$
	Control Negativo	0 UFC
	Control ambiental	< 10 UFC/placa
ASD	pH	5,4 – 5,8
	Apariencia antes de la prueba	Amarillo opalescente
	Promoción: <i>C. albicans</i>	$50\% \leq R \leq 200\%$
	<i>A. niger</i>	$50\% \leq R \leq 200\%$
	Control Negativo	0 UFC
	Control ambiental	< 10 UFC/placa

ANEXO 3

HOJAS DE REGISTRO DE PROMOCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Tabla A11. Hojas de registros de Promoción de medios del CTS80-01-Ref.

Medio de Cultivo				CTS80-01-Ref				
Fecha Inicio:		14-Feb-19		Fecha Final:		16-Feb-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		0 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	32		32	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	19		19	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	76		76	Si
Control	NA	NA	NA	0	0		0	No

Fecha Inicio:		26-Feb-19		Fecha Final:		28-Feb-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	31	28	30	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	17	14	16	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	97	82	90	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		12-Mar-19		Fecha Final:		14-Mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	21	33	27	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	6	9	8	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	109	93	101	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		5-Apr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	30	37	34	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	16	18	17	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	81	83	82	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		13-May-19		Fecha Final:		15-May-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	19	26	23	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	19	27	23	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	80	76	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Tabla A12. Hojas de registros de Promoción de medios del CTS80-01-TA.

Medio de Cultivo				CTS80-01-TA				
Fecha Inicio:		26-Feb-19		Fecha Final:		28-Feb-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	25	33	29	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	20	18	19	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	77	83	80	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		12-Mar-19		Fecha Final:		14-Mar-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	20	24	22	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	4	6	5	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	83	81	82	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		5-Apr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	41	18	30	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	15	18	17	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	77	88	83	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		13-May-19		Fecha Final:		15-May-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	17	28	23	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	28	36	32	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	75	73	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Tabla A13. Hojas de registros de Promoción de medios del CTS80-02-Ref.

Medio de Cultivo				CTS80-02-Ref				
Fecha Inicio:		26-Feb-19		Fecha Final:		28-Feb-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		0 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	44	37	41	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	16	17	17	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	136	121	129	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		4-Mar-19		Fecha Final:		7-Mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	35	35	35	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	20	28	24	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	74	73	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		5-Apr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	34	32	33	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	11	11	11	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	68	63	66	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		23-Apr-19		Fecha Final:		25-Apr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	26	28	27	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	8	12	10	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	65	67	66	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		4-Jun-19		Fecha Final:		7-Jun-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	29	30	30	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	21	35	28	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	49	59	54	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Tabla A14. Hojas de registros de Promoción de medios del CTS80-02-TA.

Medio de Cultivo				CTS80-02-TA				
Fecha Inicio:		4-Mar-19		Fecha Final:		7-Mar-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	28	24	26	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	28	28	28	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	98	88	93	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		5-Apr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	28	34	31	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	21	14	18	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	91	74	83	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		23-Apr-19		Fecha Final:		25-Apr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	20	24	22	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	4	9	7	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	70	74	72	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		4-Jun-19		Fecha Final:		7-Jun-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	33	35	34	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	35	28	32	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	49	60	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Tabla A15. Hojas de registros de Promoción de medios del CTS80-03-Ref.

Medio de Cultivo				CTS80-03-Ref				
Fecha Inicio:		12-Mar-19		Fecha Final:		15-Mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		0 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	14	27	21	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	5	8	7	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	110	103	107	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		5-Apr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	33	28	31	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	9	10	10	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	74	74	74	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		23-Apr-19		Fecha Final:		25-Apr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	26	28	27	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	8	12	10	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	65	67	66	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		13-May-19		Fecha Final:		15-May-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	19	22	21	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	9	10	10	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	78	81	80	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		4-Jun-19		Fecha Final:		7-Jun-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S. aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	35	36	36	Si
<i>P. aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	28	29	29	Si
<i>B. subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	45	60	53	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Tabla A16. Hojas de registros de Promoción de medios del CTS80-03-TA.

Medio de Cultivo				CTS80-03-TA				
Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		5-Apr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	29	16	23	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	20	17	19	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	80	63	72	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		23-Apr-19		Fecha Final:		25-Apr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	20	24	22	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	4	9	7	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	70	74	72	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		13-May-19		Fecha Final:		15-May-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	19	25	22	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-Jul-19	42	2	5	4	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	75	73	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Fecha Inicio:		4-Jun-19		Fecha Final:		7-Jun-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Crecimiento
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-Jun-19	42	36	39	38	Si
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	25	40	33	Si
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	65	75	70	Si
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	No

Tabla A17. Hojas de registros de Promoción de medios del ATS-01-Ref.

Medio de Cultivo				ATS-01-Ref				
Fecha Inicio:		14-feb-19		Fecha Final:		18-feb-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo:		0 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	32	-	32	76
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	19	-	19	45
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	76	-	76	103
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	27	-	27	52
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	29	-	29	69
Control	NA	NA	NA	0	0	-	0	0

Fecha Inicio:		26-feb-19		Fecha Final:		1-mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo:		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	31	28	30	71
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	17	14	16	38
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	97	82	90	122
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	29	43	36	69
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	30	31	31	74
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		12-mar-19		Fecha Final:		15-mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo:		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	21	33	27	64
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	6	9	8	19
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	109	93	101	136
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	40	46	43	83
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	23	27	25	60
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		3-abr-19		Fecha Final:		5-abr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo:		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	30	37	34	81
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	16	18	17	40
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	81	83	82	111
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	25	38	32	62
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	41	41	41	98
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		13-may-19		Fecha Final:		17-may-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo:		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	19	26	23	55
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	32	27	30	52
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	80	76	103
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	27	32	30	58
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	36	43	40	95
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A18. Hojas de registros de Promoción de medios del ATS-01-TA.

Medio de Cultivo

ATS-01-TA

Fecha Inicio: 26-feb-19 Fecha Final: 1-mar-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 15 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	25	33	29	69
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	20	18	19	45
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	77	83	80	108
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	26	42	34	65
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	36	39	38	90
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 12-mar-19 Fecha Final: 15-mar-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 30 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	20	24	22	52
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	4	6	5	12
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	83	81	82	111
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	47	51	49	94
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	31	29	30	71
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 3-abr-19 Fecha Final: 5-abr-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 60 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	41	18	30	71
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	15	18	17	40
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	77	88	83	112
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	26	36	31	60
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	35	30	33	79
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 13-may-19 Fecha Final: 17-may-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 90 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	17	28	23	55
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	28	36	32	55
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	75	73	99
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	33	35	34	65
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	38	45	42	100
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A19. Hojas de registros de Promoción de medios del ATS-02-Ref.

Medio de Cultivo				ATS-02-Ref				
Fecha Inicio:		26-feb-19		Fecha Final:		1-mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		0 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	44	37	41	98
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	16	17	17	40
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	136	121	129	174
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	32	39	36	69
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	28	37	33	79
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		4-mar-19		Fecha Final:		7-mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	35	35	35	83
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	20	28	24	57
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	74	73	99
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	43	45	44	85
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	40	46	43	102
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		3-abr-19		Fecha Final:		8-abr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	34	32	33	79
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	11	11	11	26
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	68	63	66	89
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	29	31	30	58
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	33	36	35	83
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		23-abr-19		Fecha Final:		26-abr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	26	28	27	64
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	8	12	10	24
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	65	67	66	89
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	40	40	40	77
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	29	31	30	71
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		4-jun-19		Fecha Final:		7-jun-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	29	30	30	71
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	21	35	28	48
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	49	59	54	73
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	42	30	36	69
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	32	34	33	79
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

ContAmt: 2ASD

Tabla A20. Hojas de registros de Promoción de medios del ATS-02-TA.

Medio de Cultivo				ATS-02-TA				
Fecha Inicio:		4-mar-19		Fecha Final:		7-mar-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	28	24	26	62
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	28	28	28	67
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	98	88	93	126
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	48	39	44	85
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	24	23	24	57
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		3-abr-19		Fecha Final:		8-abr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	28	34	31	74
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	21	14	18	43
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	91	74	83	112
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	34	31	33	63
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	48	33	41	98
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		23-abr-19		Fecha Final:		26-abr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	20	24	22	52
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	4	9	7	17
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	70	74	72	97
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	37	39	38	73
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	28	34	31	74
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		4-jun-19		Fecha Final:		7-jun-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	33	35	34	81
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	35	28	32	55
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	49	60	81
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	52	35	44	85
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	29	28	29	69
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A21. Hojas de registros de Promoción de medios del ATS-03-Ref.

Medio de Cultivo				ATS-03-Ref				
Fecha Inicio:		4-mar-19		Fecha Final:		7-mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		0 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	34	31	33	79
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	23	22	23	55
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	69	90	80	108
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	35	37	36	69
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	41	33	37	88
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		12-mar-19		Fecha Final:		15-mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	14	27	21	50
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	5	8	7	17
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	110	103	107	145
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	36	31	34	65
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	26	15	21	50
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		3-abr-19		Fecha Final:		8-abr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	33	28	31	74
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	9	10	10	24
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	74	74	74	100
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	31	34	33	63
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	46	30	38	90
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		13-may-19		Fecha Final:		17-may-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	19	22	21	50
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	9	10	10	24
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	78	81	80	108
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	43	46	45	87
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	29	30	30	71
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		4-jun-19		Fecha Final:		7-jun-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	35	36	36	86
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	28	29	29	50
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	45	60	53	72
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	38	42	40	77
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	29	34	32	76
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A22. Hojas de registros de Promoción de medios del ATS-03-TA.

Medio de Cultivo

ATS-03-TA

Fecha Inicio: 12-mar-19 Fecha Final: 15-mar-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 15 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	22	25	24	57
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	12	11	12	29
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	101	125	113	153
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	36	35	36	69
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	25	21	23	55
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 3-abr-19 Fecha Final: 8-abr-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 30 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	29	16	23	55
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	20	17	19	45
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	80	63	72	97
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	31	29	30	58
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	33	53	43	102
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 13-may-19 Fecha Final: 17-may-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 60 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	19	25	22	52
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1019-1	31-jul-19	42	2	5	4	10
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	71	75	73	99
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	45	45	45	87
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	25	40	33	79
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 4-jun-19 Fecha Final: 7-jun-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 90 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>S.aureus</i>	6538	485-558-1	30-jun-19	42	36	39	38	90
<i>P.aeruginosa</i>	9027	484-1072-2	31-Ene-20	58	25	40	33	57
<i>B.subtilis</i>	6633	486-709-2	30-Abr-20	74	65	75	70	95
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	32	39	36	69
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	34	35	35	83
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A23. Hojas de registros de Promoción de medios del ASD-01-Ref.

Medio de Cultivo				ASD-01-Ref			
Fecha Inicio:		14-feb-19		Fecha Final:		18-feb-19	
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		0 días	
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)	Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	50	50	96
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	22	22	52
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0

Fecha Inicio:		26-feb-19		Fecha Final:		1-mar-19	
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		15 días	
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)	Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	38 40	39	75
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	37 34	36	86
Control	NA	NA	NA	0	0 0	0	0

Fecha Inicio:		12-mar-19		Fecha Final:		15-mar-19	
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		30 días	
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)	Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	41 58	50	96
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	28 34	31	74
Control	NA	NA	NA	0	0 0	0	0

Fecha Inicio:		3-abr-19		Fecha Final:		5-abr-19	
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		60 días	
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)	Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	35 29	32	62
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	26 41	34	81
Control	NA	NA	NA	0	0 0	0	0

Fecha Inicio:		13-may-19		Fecha Final:		17-may-19	
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		90 días	
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)	Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-mar-20	52	27 29	28	54
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-feb-20	42	27 30	29	69
Control	NA	NA	NA	0	0 0	0	0

Tabla A24. Hojas de registros de Promoción de medios del ASD-01-TA.

Medio de Cultivo

ASD-01-TA

Fecha Inicio: 26-Feb-19 Fecha Final: 1-Mar-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 15 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	42	47	45	87
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	24	32	28	67
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 12-Mar-19 Fecha Final: 15-Mar-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 30 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	46	39	43	83
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	34	25	30	71
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 3-Apr-19 Fecha Final: 5-Apr-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 60 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	33	29	31	60
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	33	32	33	79
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 13-May-19 Fecha Final: 17-May-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 90 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	20	32	26	50
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	28	28	28	67
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A25. Hojas de registros de Promoción de medios del ASD-03-Ref.

Medio de Cultivo				ASD-03-Ref				
Fecha Inicio:		4-Mar-19		Fecha Final:		7-Mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		0 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	36	37	37	71
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	22	23	23	55
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		12-Mar-19		Fecha Final:		15-Mar-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	46	38	42	81
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	34	35	35	83
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		8-Apr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	39	31	35	67
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	53	34	44	105
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		23-Apr-19		Fecha Final:		26-Apr-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	30	48	39	75
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	21	25	23	55
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		4-Jun-19		Fecha Final:		7-Jun-19		
Almacenamiento:		Refrigeración		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	47	58	53	102
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	28	29	29	69
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A26. Hojas de registros de Promoción de medios del ASD-03-TA.

Medio de Cultivo				ASD-03-TA				
Fecha Inicio:		12-Mar-19		Fecha Final:		15-Mar-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		15 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	52	44	48	92
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	33	25	29	69
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		3-Apr-19		Fecha Final:		8-Apr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		30 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	34	23	29	56
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	39	19	29	69
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		23-Apr-19		Fecha Final:		26-Apr-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		60 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	43	49	46	88
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	23	24	24	57
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio:		4-Jun-19		Fecha Final:		7-Jun-19		
Almacenamiento:		T. Ambiental		Tiempo		90 días		
Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	41	42	42	81
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	31	26	29	69
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A27. Hojas de registros de Promoción de medios del ASD-04-Ref.

Medio de Cultivo ASD-04-Ref

Fecha Inicio: 4-Mar-19 Fecha Final: 7-Mar-19
 Almacenamiento: Refrigeración Tiempo: 0 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	45	38	42	81
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	31	33	32	76
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 12-Mar-19 Fecha Final: 15-Mar-19
 Almacenamiento: Refrigeración Tiempo: 15 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	42	25	34	65
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	39	55	47	112
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 3-Apr-19 Fecha Final: 8-Apr-19
 Almacenamiento: Refrigeración Tiempo: 30 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	39	21	30	58
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	36	37	37	88
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 13-May-19 Fecha Final: 17-May-19
 Almacenamiento: Refrigeración Tiempo: 60 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	39	48	44	85
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	22	23	23	55
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 4-Jun-19 Fecha Final: 7-Jun-19
 Almacenamiento: Refrigeración Tiempo: 90 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C.albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	42	50	46	88
<i>A.brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	31	40	36	86
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabla A28. Hojas de registros de Promoción de medios del ASD-04-TA.

Medio de Cultivo ASD-04-TA

Fecha Inicio: 12-Mar-19 Fecha Final: 15-Mar-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 15 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	62	46	54	104
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	40	28	34	81
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 3-Apr-19 Fecha Final: 8-Apr-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 30 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	35	37	36	69
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	25	26	26	62
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 13-May-19 Fecha Final: 17-May-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 60 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	45	46	46	88
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	20	26	23	55
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

Fecha Inicio: 4-Jun-19 Fecha Final: 7-Jun-19
 Almacenamiento: T. Ambiental Tiempo: 90 días

Microorganismo utilizado	ATCC	Lote	Vence	Valor calculado para inóculo estandarizado (UFC)	Recuperación (UFC)		Promedio (UFC)	Factor R
<i>C. albicans</i>	10231	443-870-1	31-Mar-20	52	38	40	39	75
<i>A. brasiliensis</i>	16404	392-801-1	29-Feb-20	42	24	41	33	79
Control	NA	NA	NA	0	0	0	0	0

ANEXO 4

PRUEBA DE RECUESTO MICROBIANO

1. Rotular todas las placas y frascos de la siguiente manera:

Recuento Medio (ATS o ASD) Producto-Código Fecha de análisis: mm.dd.aa

Ejemplos:

Recuento ATS	Recuento ASD	Recuento CTS80
Crema de Rosas B1	Clorfenamina C2	Colestiramina D3
Fecha: 05.06.19	Fecha: 05.06.19	Fecha: 05.06.19

Figura A5. Ejemplos de etiquetas de la prueba de Recuento Microbiano.

Hay que recordar que se imprimen 4 etiquetas por producto, siendo estas 2 para el recuento total de bacterias aerobias o RTMA en ATS y 2 para el recuento total de hongos y levaduras o RTCHL en ASD.

2. Trabajar en una Cámara de Flujo Laminar (CFL).
3. Antes de ingresar todo el material a la CFL, desinfectar la superficie de las botellas de medio de cultivo y de las muestras con alcohol etílico al 70% o alcohol isopropílico al 70%, además de los materiales que se utilicen en la prueba, posteriormente se limpia con una mantilla estéril.
4. Ingresar la balanza granataria y las placas rotuladas dentro de la CFL.
5. Se cierra la CFL y se enciende el UV por 5-10 min. Se apaga y se espera 5-10 min.
6. Utilizar guantes estériles para el manejo de todas las muestras.
7. Colocar 1 frasco de medio de cultivo CTS80 por cada producto y adicionalmente, se utiliza un frasco para el Control Negativo.
8. Pesar 10 g (en caso de los productos A, B y D) o tomar 10 mL (en caso del producto C) de las muestras de análisis tomada de 3 envases sin abrir

previamente. Tomar la cantidad más equitativa posible entre los 3 envases (sean los tubos de cremas, el jarabe o el polvo a pesar). El pesado se realiza sobre el frasco de CTS80 90 mL, siendo la dilución 1:10.

9. Transferir 1 mL de la dilución y se agrega a cada una de las 4 placas de Petri correspondiente al producto.
10. Agregar a cada placa para RTMA (las dos de ATS) aproximadamente 15 a 20 mL de ATS previamente fundido con las indicaciones descritas en la prueba de Promoción. Agregar a cada placa para RTCHL (las dos placas de ASD) aproximadamente 15 a 20 mL de ASD previamente fundido. Mezclar mediante rotación suave como se observa en la Figura A4 y reposar hasta que el contenido solidifique completamente.
11. Invertir las placas de agar ya solidificadas.
12. Una vez solidificado, incubar las placas de RTMA a una temperatura entre 30 y 35°C por 3 días e incubar las placas de RTCHL a una temperatura entre 20 y 25°C por 5 días.

Control Negativo

El control Negativo de la prueba de límite microbiano se refiere al análisis de toda la prueba sin la muestra de análisis. Es decir, se realiza un frasco adicional de CTS80 que se trata de la misma manera que los productos de análisis y también se agregan a los medios de cultivo sólidos. Este debe obtener como resultado final la ausencia de crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo utilizado, si este resultado da "Positivo" debe repetirse toda la prueba debido a que hay contaminación en algún punto del proceso.

Control Positivo del Recuento

El control positivo de la prueba de límite microbiano se refiere, en este documento, a la inoculación de cepas microbiológicas en el medio de cultivo en presencia de la muestra; es decir, se toma como control positivo de la prueba al realizar la 'Prueba de

Aptitud del Método', este con el fin de garantizar que la muestra no inhibe el crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo. Por lo tanto, el microorganismo también debe crecer en presencia del producto de análisis. El resultado debe ser "Positivo" del crecimiento de microorganismos, si da un resultado negativo, indica que la muestra inhibe el crecimiento de microorganismos y por ende debe buscarse un método alternativo para el análisis de tal producto.

Criterios de Aceptación e Interpretación de Resultados

Al finalizar la incubación, examinar las placas para la verificación de crecimiento de microorganismos, contando el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes.

- Si se detectan colonias de hongos en placas de RTMA, contarlas como UFC de bacterias (parte del RTMA).
- Si se detectan colonias de bacterias en placas de RTCHL, contarlas como UFC de hongos y levaduras (parte del RTCHL).

Cuando no se recuperan colonias microbianas u hongos y levaduras, se interpreta como resultado "menos de 10 UFC/mL o 10 UFC/g de muestra", según sea el caso.

En el capítulo <1111> de USP sobre el *Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Criterios de Aceptación para Preparaciones Farmacéuticas y Sustancias de Uso Farmacéutico* menciona los criterios de aceptación para RTMA y RTCHL según la forma farmacéutica que corresponde.

Tabla A29. Criterios de Aceptación para el Recuento según forma farmacéutica.

Ruta de Administración	Producto	RTMA (UFC/g o UFC/mL)	RTCHL (UFC/g o UFC/mL)
Preparaciones no acuosas para uso oral	Polvo de Colestiramina	10^3	10^2
Preparaciones acuosas para uso oral	Jarabe de Clorfenamina	10^2	10^1
Uso tópico	Ungüento de ácido salicílico Crema de Rosas	10^2	10^1

Se debe interpretar el criterio de aceptación para la calidad microbiológica, según USP, como:

- 10^1 UFC: recuento máximo aceptable = 20;
- 10^2 UFC: recuento máximo aceptable = 200;
- 10^3 UFC: recuento máximo aceptable = 2000; y así sucesivamente.