

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



“Validación del Examen Microbiológico del Bicarbonato de Sodio y Sulfadiazina de plata según USP vigente”

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Marlon Miguel Morales Moisela

Lima, Perú

2018

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE GRÁFICOS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	9
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	9
2.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	10
III. MARCO REFERENCIAL	11
3.1 ANTECEDENTES	11
3.1.1 Validación de ensayos microbiológicos	11
3.1.2 Normativa nacional	12
3.1.3 Normativa internacional.....	14
3.1.4 Sulfadiazina de Plata	17
3.1.5 Bicarbonato de Sodio.....	18
3.1.6 Cepas certificadas.....	18
IV. OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
V. HIPÓTESIS	25
5.1 LUGAR DONDE SE REALIZARÁ.....	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 PARTICIPANTES.....	26
6.2 INSTRUMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	26
6.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	27

6.4	OPERALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	27
VII.	PROCEDIMIENTOS	28
7.1	ESTANDARIZACIÓN DE LAS CEPAS DE PRUEBA	28
7.2	PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	28
7.3	PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y PRUEBA DE MICROORGANISMO ESPECÍFICO DEL BICARBONATO DE SODIO POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN.....	29
7.4	PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y PRUEBA DE MICROORGANISMO ESPECÍFICO DE SULFADIAZINA DE PLATA POR EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA.	30
7.5	TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	32
VIII.	RESULTADOS	33
8.1	ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS.....	33
8.2	VALIDACIÓN DEL EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES – PRUEBA DE RECuento MICROBIANO DE SULFADIAZINA DE PLATA POR EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA.....	33
8.3	VALIDACIÓN DEL EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES – PRUEBA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS DE SULFADIAZINA DE PLATA POR EL MÉTODO DE VERTIDO EN PLACA.....	37
8.4	VALIDACIÓN DEL EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES – PRUEBA DE RECuento MICROBIANO DE BICARBONATO DE SODIO POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	39
8.5	VALIDACIÓN DEL EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES – PRUEBA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS DE BICARBONATO DE SODIO POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	41
IX.	DISCUSIÓN	43
X.	CONCLUSIONES.....	46
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
XII.	ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 RECUENTO DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CEPAS PRUEBA EN LAS DILUCIONES DE TRABAJO SELECCIONADAS	35
GRÁFICO 2 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LOS TRES LOTES EVALUADOS DE SULFADIAZINA DE PLATA..	36
GRÁFICO 3 RESULTADOS DE LA PRECISIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO A SULLFADIAZINA DE PLATA.....	38
GRÁFICO 4 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LOS TRES LOTES EVALUADOS DE BICARBONATO DE SODIO .	40
GRÁFICO 5 RESULTADOS DE LA PRECISIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EXPUESTO A BICARBONATO DE SODIO	41

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS EN LAS DILUCIONES 10^{-7} A 10^{-9}	52
TABLA 2 SUSPENSIONES MICROBIANAS ENTRE 10 – 100 UFC	52
TABLA 3 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS.....	53
TABLA 4 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS ENTRE LOS GRUPOS DE PRUEBA (GP) Y GRUPOS CONTROL (GC) DE LOS TRES LOTES DE SULFADIAZINA DE PLATA	54
TABLA 5 VALORES DE LA PRUEBA “t” DE STUDENT PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES DE LOS TRES LOTES EVALUADOS DE SULFADIAZINA DE PLATA.....	55
TABLA 6.1 PROMEDIO DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS OBTENIDO DURANTE LAS 72 H, 96 H Y 120 H DE LOS TRES LOTES EVALUADOS DE SULFADIAZINA DE PLATA	56
TABLA 6.2 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y VALOR “t” OBTENIDO DE LOS TRES LOTES EVALUADOS	56
TABLA 7 RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA VALIDACIÓN DEL RECUENTO MICROBIANO DE SULFADIAZINA DE PLATA	57
TABLA 8 RESULTADOS OBSERVADOS EN LA RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS DURANTE 24 H, 48 H Y 72 H DE INCUBACIÓN.....	58
TABLA 9.1 RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS UTILIZADOS EN LA VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS DE SULFADIAZINA DE PLATA	59
TABLA 9.2 RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS UTILIZADOS EN LA VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS DE SULFADIAZINA DE PLATA	60
TABLA 10 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN OBTENIDOS ENTRE LOS GRUPOS DE PRUEBA (GP) Y GRUPOS CONTROL (GC) DE LOS TRES LOTES DE BICARBONATO DE SODIO	61
TABLA 11 VALORES DE LA PRUEBA “t” DE STUDENT PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES DE LOS TRES LOTES EVALUADOS DE BICARBONATO DE SODIO	61
TABLA 12.1 PROMEDIO DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS OBTENIDO DURANTE LAS 72 H, 96 H Y 120 H DE LOS TRES LOTES EVALUADOS DE BICARBONATO DE SODIO.....	62
TABLA 12.2 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y VALOR “t” OBTENIDO DE LOS TRES LOTES EVALUADOS	62
TABLA 13 RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA VALIDACIÓN DEL RECUENTO MICROBIANO DE BICARBONATO DE SODIO.....	63
TABLA 14 RESULTADOS OBSERVADOS EN LA RECUPERACIÓN DEL MICROORGANISMO PATÓGENO EN MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS DURANTE 24 H, 48 H Y 72 H DE INCUBACIÓN.....	64
TABLA 15 RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS UTILIZADOS EN LA VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS DE BICARBONATO DE SODIO.....	64

RESUMEN

La industria farmacéutica ha alcanzado un auge sobresaliente en el Perú, siendo uno de los contribuyentes económicos más resaltantes en el país. Por tal motivo, la producción de fármacos debe estar ligada a la evaluación de la calidad físico-química y microbiológica de cada uno de estos. En el caso del control microbiológico, el ensayo es general para productos no estériles, sin embargo, debido a la variedad de fármacos existentes en esta categoría, esta técnica debe regirse a un método de validación diseñado específicamente para cada producto.

Debido a lo expuesto anteriormente, este trabajo de tesis se basa en la validación del ensayo microbiológico de sulfadiazina de plata y del bicarbonato de sodio por los métodos de vertido en placa y filtración por membrana respectivamente, de acuerdo a la Farmacopea Americana (USP). Para ello, es necesario contar con cepas microbianas certificadas las cuales van a pasar por un proceso de estandarización con el fin de obtener un inóculo no mayor a 10 – 100 UFC para usar en la validación. El ensayo microbiológico se divide en prueba de recuento microbiano, de acuerdo a USP capítulo 61 y prueba de microorganismos específicos de acuerdo a USP capítulo 62. Para el caso de la sulfadiazina de plata, se utilizarán cinco cepas para el recuento microbiano: *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 10231 y *A. brasiliensis* ATCC 16404, mientras que en microorganismos específicos se utilizarán las cepas *E. coli* ATCC 8739, *S. typhimurium* ATCC 14028, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. En el caso del bicarbonato de sodio para la prueba de recuento se utilizarán las cepas mencionadas anteriormente y en el caso de microorganismos específicos se utilizará únicamente *E. coli*. Para ambas pruebas se calcularán las variables de exactitud, precisión, especificidad y robustez de acuerdo a USP capítulo 1225. En cada ensayo se realizará la promoción de crecimiento de los medios de cultivo utilizados para garantizar su correcto funcionamiento.

En los resultados se demuestra que es válido el ensayo microbiológico para sulfadiazina de plata por el método de vertido en placa y para bicarbonato de sodio por el método de filtración por membrana. No obstante, se obtiene también que para la prueba de microorganismos específicos de sulfadiazina de plata es importante mantener en incubación el medio de cultivo de enriquecimiento por no menos de 48 h para asegurar la recuperación de microorganismos, debido posiblemente a una actividad bacteriostática de la muestra.

Palabras Clave: Sulfadiazina de plata, bicarbonato de sodio, USP

ABSTRACT

The pharmaceutical industry has reached an outstanding upgrade in Peru, by contributing in the most important economic areas in the country. Because of this reason, the production of drugs must be evaluated by meticulous quality control evaluation performed by physiochemical and microbiological assays. Referring about the last one, the principal assay is the non-sterile products microbiological examination, however, due to the huge variety of drugs in this category, these techniques used have to be validated designing an specific assay for each pharmaceutical product.

Thus, this thesis has its basis in validate the microbiological assay of silver sulfadiazine and sodium bicarbonate using poured on plate and membrane filtration methods respectively, according to the U.S. Pharmacopeia (USP). So that, is necessary to count on certificated bacteria and fungi strains to realize an standarization process in order to obtain an aliquot that contains 10 – 100 CFU, this aliquot is going to be use in the validation assay. The microbiological examination is divided in two tests: microbiological counting test, according to chapter 61 of USP, and specific microorganism test, according to chapter 62 of USP. The silver sulfadiazine microbiological counting test will be accomplished with five certificated strains: *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 10231 and *A. brasiliensis* ATCC 16404; instead of the specific microorganisms test, that will be using *E. coli* ATCC 8739, *S. typhimurium* ATCC 14028, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. In case of sodium bicarbonate microbiological counting test, it will be realized with the same five strains mentioned before; nevertheless, the specific microorganism test, will be realized with only *E. coli*. For both validation assays, the variables of accurancy, precisión, specificity and robustness will be calculated accordind to USP's chapet 1225. The growth promotion test will ve also executed for each experimental assay in this thesis in order to assure the correct functioning of the culture media.

Results show that the microbiological assay for silver sulfadiazine and sodium bicarbonated are valid for each method that have been performed. However, it is also important to mention that the results of the specific microorganism test for silver sulfadiazine prove that the enrichment media incubation time must be no less tan 48 hours, in order to be sure that the test i sable to recover any pathogen microorganism. This characteristic could be due to a bacteriostatic activity of the sample.

Key words: silver sulfadiazine, sodium bicarbonate, USP

I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica ha alcanzado un auge sobresaliente en el Perú, siendo uno de los contribuyentes económicos más resaltantes en el país. Asimismo, su influencia en el sector salud les obliga a mantener ciertos lineamientos, normas y procedimientos estandarizados por la autoridad competente, estos se encuentran especificados en la Ley N° 29459: Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios (MINSA, 2013), y, a su vez, la auditoría y vigilancia de las industrias farmacéuticas está sometida a la Dirección General de Medicamentos y Drogas (DIGEMID) de acuerdo al D.S. 016-2011-SA.

La producción de fármacos debe estar ligada a la evaluación de la calidad físico-química y microbiológica de cada uno de estos, siendo la Farmacopea Americana (USP), la base normativa principal para el desarrollo de los análisis de control de calidad. No obstante, las generalidades sobre las buenas prácticas de laboratorio y la validación de ensayos analíticos en productos farmacéuticos son dispuestas por los organismos nacionales. Los ensayos de control de calidad son, principalmente, realizados por el Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC) del Instituto Nacional de Salud, el cual funciona como ente regulador para que cada producto farmacéutico, dispositivo médico o producto sanitario cumpla con las especificaciones que se le atribuyen.

En el caso del control microbiológico, el ensayo es general para productos no estériles, sin embargo, debido a la variedad de fármacos existentes en esta categoría, esta técnica debe regirse a un método de validación diseñado específicamente para cada producto. Si bien, la autoridad nacional no exige la validación de un método farmacopeico, sugiere que se asegure que el producto a analizar pueda adecuarse al método normalizado y permita obtener resultados concluyentes. Por tal motivo, es justificable un método de validación de ensayos.

Los análisis microbiológicos para productos no estériles se dividen en dos métodos: filtración de membrana y vertido en placa. Para asegurar que cada método es adecuado para recuperar la posible carga microbiana que los productos farmacéuticos puedan presentar, se realizará, en este proyecto de tesis, la validación del análisis microbiológico del Bicarbonato de Sodio, por el método de filtración; y de la Sulfadiazina de plata, por el método de vertido en placa.

II. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Planteamiento del problema

Los ensayos de control microbiológico para productos farmacéuticos se encuentran actualmente estandarizados en la referencia bibliográfica internacional (USP), y debidamente desarrollados en documentos otorgados por la autoridad competente (DIGEMID, CNCC). No obstante, estas metodologías se evaluaron desde el punto de vista general para los productos farmacéuticos, es decir, que existe una probabilidad que no todos los medicamentos desarrollados pueden adecuarse a estas metodologías debido a su composición química (antibióticos, antihistamínicos, presencia de conservantes) o sus características físicas (ungüentos insolubles, polvos para suspensión). Por tal motivo, es poco probable asegurar, para este tipo de productos, que cumplen con los estándares de calidad que exige la autoridad nacional para su comercialización. Asimismo, a esto se añade la innovación actual en fármacos, generando productos de liberación prolongada o de altas concentraciones de principios activos, lo que dificulta más la idea de tener un método de ensayo microbiológico general para estos productos. Por estas razones, los ensayos de validación son necesarios para la estandarización del ensayo de un producto o insumo farmacéutico.

2.2 Formulación del problema

Actualmente, la validación y/o verificación de los ensayos microbiológicos para evaluar la calidad de los productos sirve para establecer la mejor forma de evaluar la calidad de los productos. Por este motivo, la autoridad competente otorga lineamientos para realizar este tipo de ensayos, sin embargo, en el caso de los controles microbiológicos no son estrictamente regulados, por ello ¿por qué estos procedimientos no son obligatorios para los laboratorios que pertenecen a industrias farmacéuticas? Además, ya que, DIGEMID y el CNCC poseen procedimientos estandarizados para la validación de procesos en la producción de fármacos ¿de qué forma la autoridad competente debe aplicar la normativa actual para exigir la realización de validaciones de los ensayos microbiológicos? Estas incógnitas, también pueden ser aplicadas hacia las industrias farmacéuticas que son responsables de un laboratorio de control de calidad, cómo, por ejemplo: ¿quién o quiénes serían los responsables en controlar, verificar, y aprobar la validación de los ensayos microbiológicos (analistas, jefes de control, directores) y cómo se puede realizar un procedimiento estandarizado para evitar congestionar los demás ensayos del laboratorio? Por último, ¿es importante para las industrias farmacéuticas, cumplir con la normativa nacional para establecer un correcto manejo de la Buenas Prácticas de Laboratorio? En este último punto, cabe resaltar que las autoridades nacionales han otorgado un tiempo limitado para que las industrias farmacéuticas tengan validados sus ensayos de control de calidad en general, incluyendo los procedimientos microbiológicos. Esto, hace referencia a la

relevancia de la validación de los ensayos microbiológicos para un laboratorio que desee acreditar sus productos a nivel internacional.

2.3 Justificación de la investigación

De acuerdo a la nota informativa N° 016-2013-DG-DIGEMID/MINSA de DIGEMID, se establece un documento técnico que especifica que los ensayos farmacopeicos realizados en los laboratorios de control de calidad de las industrias farmacéuticas deben ser adecuados para asegurar que el producto cumpla sus especificaciones, en otras palabras, es necesario realizar la validación de los ensayos microbiológicos de los productos farmacéuticos para asegurar la calidad de los mismos. La validación de los ensayos microbiológicos implica afirmar que el fármaco en análisis es potencialmente contaminable con los microorganismos utilizados como indicadores de contaminación ambiental y microorganismos patógenos perjudiciales de la salud humana. Asimismo, permite elucidar cuales son los posibles componentes del fármaco o factores que inhiban el crecimiento bacteriano o que pueda influir de forma negativa el desarrollo del análisis. Por último, la validación de estos ensayos, en armonía con el documento técnico, implica realizar los cálculos de especificidad, exactitud, precisión y límites cuantitativos y cualitativos, los cuales generan una visión de cómo mejorar el rendimiento del análisis microbiológico.

III. MARCO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

3.1.1 Validación de ensayos microbiológicos

Se entiende como validación al proceso o ensayo que demuestra que una técnica analítica, no necesariamente estandarizada, utilizada para la evaluación de la calidad de un fármaco es la adecuada para los propósitos que se utiliza (FDA, 2015). No obstante, esta definición puede confundirse con la verificación de técnicas analíticas, la cual se diferencia porque una verificación consiste en demostrar una la eficacia de una técnica previamente estandarizada por referencias internacionales (USP 39 <1226>, 2016).

Debido a lo mencionado anteriormente, una validación es conveniente para una industria farmacéutica porque disminuye el riesgo de un análisis erróneo y aumenta la probabilidad de disminuir costos innecesarios; asimismo, un proceso de validación debe realizarse siempre que exista una técnica nueva, nuevos equipos o que el producto que se vaya analizar, no tenga una base de datos histórica (Jatto, E. *et al* 2002).

En los ensayos microbiológicos es más probable encontrar variables en métodos de análisis debido a que el crecimiento bacteriano obedece a las características de diversidad biológica que tienen los seres vivos en general; por lo tanto, la validación de ensayos microbiológicos debe realizarse en todos los aspectos que puedan afectar el crecimiento bacteriano (Sutton, S. 2005). En este sentido, la referencia internacional permite utilizar variables y parámetros que acogen los aspectos mencionados anteriormente, como la precisión y exactitud, que evalúan el crecimiento microbiano con respecto a un control y su mantenimiento en un tiempo determinado; y la especificación y robustez, los cuales evalúan que los resultados obtenidos correspondan a las especies bacterianas utilizadas y que dichos resultados permanezcan iguales en un tiempo determinado (Vu, N. *et al* 2014).

Por otro lado, la realización de estos ensayos de validación es competencia de las industrias farmacéuticas así como también de los entes reguladores nacionales como la Dirección General de Medicamentos y Drogas (DIGEMID), el Instituto Nacional de Salud (INS) y el Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC), cuyos criterios están en armonía con los lineamientos otorgados por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la referencia internacional Farmacopea Americana (USP), en este sentido, ambas partes buscan asegurar la calidad de los medicamentos y dispositivos médicos fabricados y comercializados en el territorio peruano (OMS, 2007).

3.1.2 Normativa nacional

En el Perú, las normas generales sobre la fabricación, control, comercialización y vigilancia de los productos farmacéuticos fueron especificadas en la Ley N° 29459 “Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios” (El Peruano, 2009), la cual especifica de qué forma la autoridad nacional (DIGEMID) debe ser capaz de autorizar la producción y distribución de fármacos bajo los criterios de las buenas prácticas de manufactura (BPM) y cómo estos productos deben ser analizados para que cumplan con sus especificaciones, como se menciona en las buenas prácticas de laboratorio (BPL). A partir de esta ley, se han generado reglamentos, normas, bases legales y manuales de técnicas analíticas que permitan el desarrollo de las industrias farmacéuticas en sus áreas más críticas. Es así que, se promulga el D.S. N° 016-2011-S.A., donde se crea el Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitario (El Peruano, 2011), en el cual se le otorga al CNCC, anexo del INS, la responsabilidad de evaluar la calidad de todos los productos farmacéuticos producidos y comercializados en el territorio peruano, así como también, exige la creación de áreas de aseguramiento de la calidad que permita la vigilancia de los procesos de fabricación y análisis de fármacos para garantizar su correcto funcionamiento.

Sin embargo, el auge de la industria farmacéutica en el Perú ha sido tal que, el CNCC no se da abasto con la cantidad de muestras ingresadas y productos nuevos que debe

verificar y/o validar sus ensayos analíticos, por ello, de acuerdo a la resolución jefatural N° 277-2012-J-OPE/INS, el INS, otorga la potestad a laboratorios terceros de ser autorizados en análisis y validación de técnicas para la evaluación de la calidad de productos farmacéuticos (INS, 2012). Permitiendo así, al INS y al CNCC auditar y controlar los procesos en este tipo de laboratorios y diseminar su carga laboral. Por otro lado, los laboratorios que pertenecen a industrias farmacéuticas se dejaron bajo la supervisión de DIGEMID, el cual, generó el documento técnico N° 016-2013-DG-DIGEMID/MINSA titulado como Manual de buenas prácticas de laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos. Este manual alberga la normativa internacional y la especificación nacional en cuanto a análisis microbiológicos y físico-químicos de medicamentos; asimismo, especifica que para validar un método de ensayo es necesario demostrar que un producto farmacéutico no inhibe la capacidad de recuperar el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras antes de ser analizado por vía regular, estos resultados deben estar debidamente sustentados en protocolos de validación aprobados por las gerencias correspondientes de cada industria (MINSA, 2013).

La normativa nacional también ha generado especificaciones para aquellas técnicas microbiológicas que se deben validar, de acuerdo al Reglamento que regula la información mínima del documento que debe obtener la validación de técnicas analíticas propias, se debe clasificar un ensayo de validación de acuerdo a las siguientes categorías (MINSA, 2016):

Categoría I: Técnicas analíticas para la cuantificación, actividad biológica o potencia de productos farmacéuticos.

Categoría II: Técnicas para la determinación de impurezas.

Categoría III: Técnicas analíticas para la determinación de las características de desempeño de un producto farmacéutico.

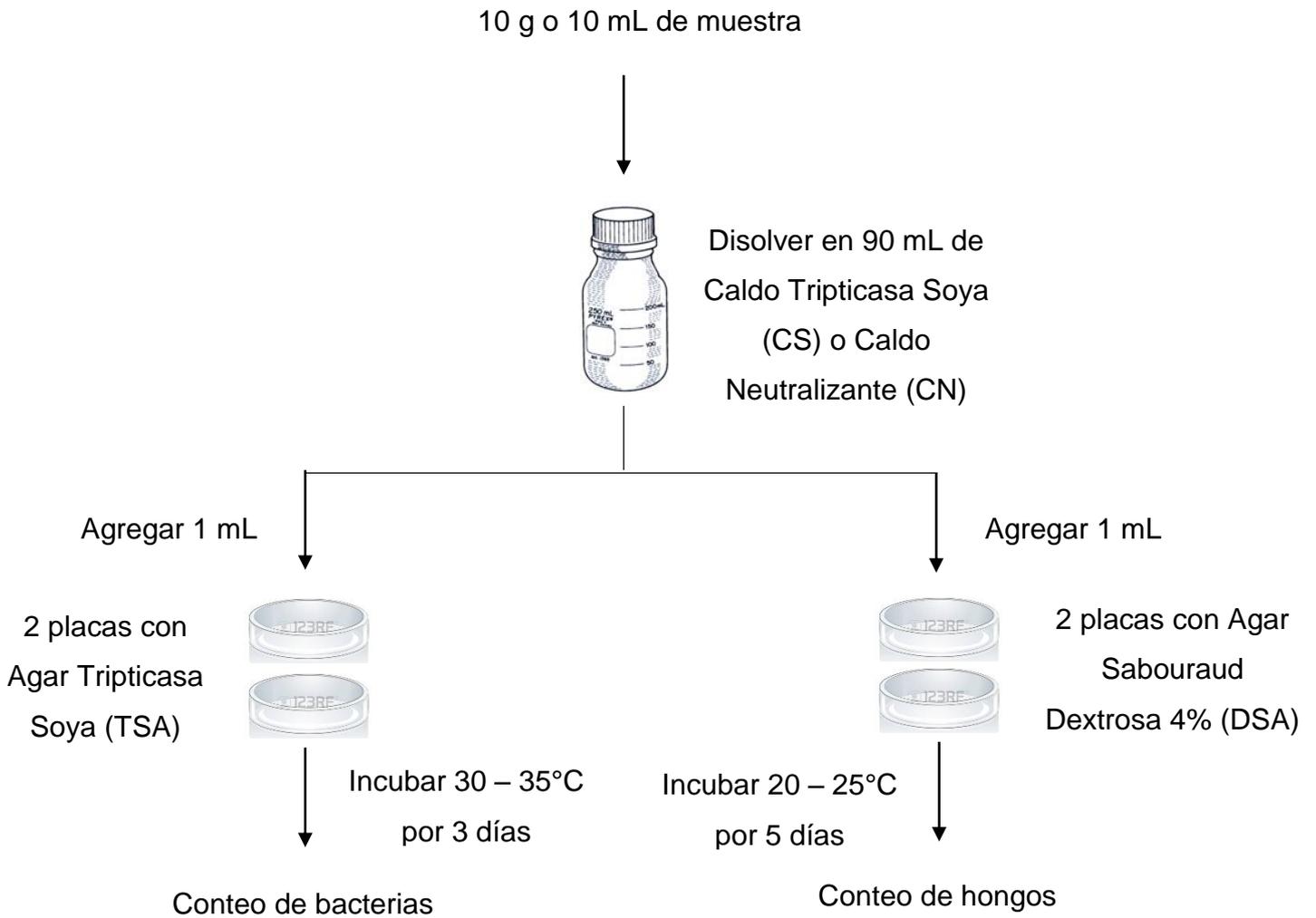
Categoría IV: Pruebas de identificación de analitos en un producto farmacéutico.

Es así que, bajo esta perspectiva, los ensayos microbiológicos de cuantificación se encuentran en la categoría I y los ensayos de especificación se encuentran en la categoría III.

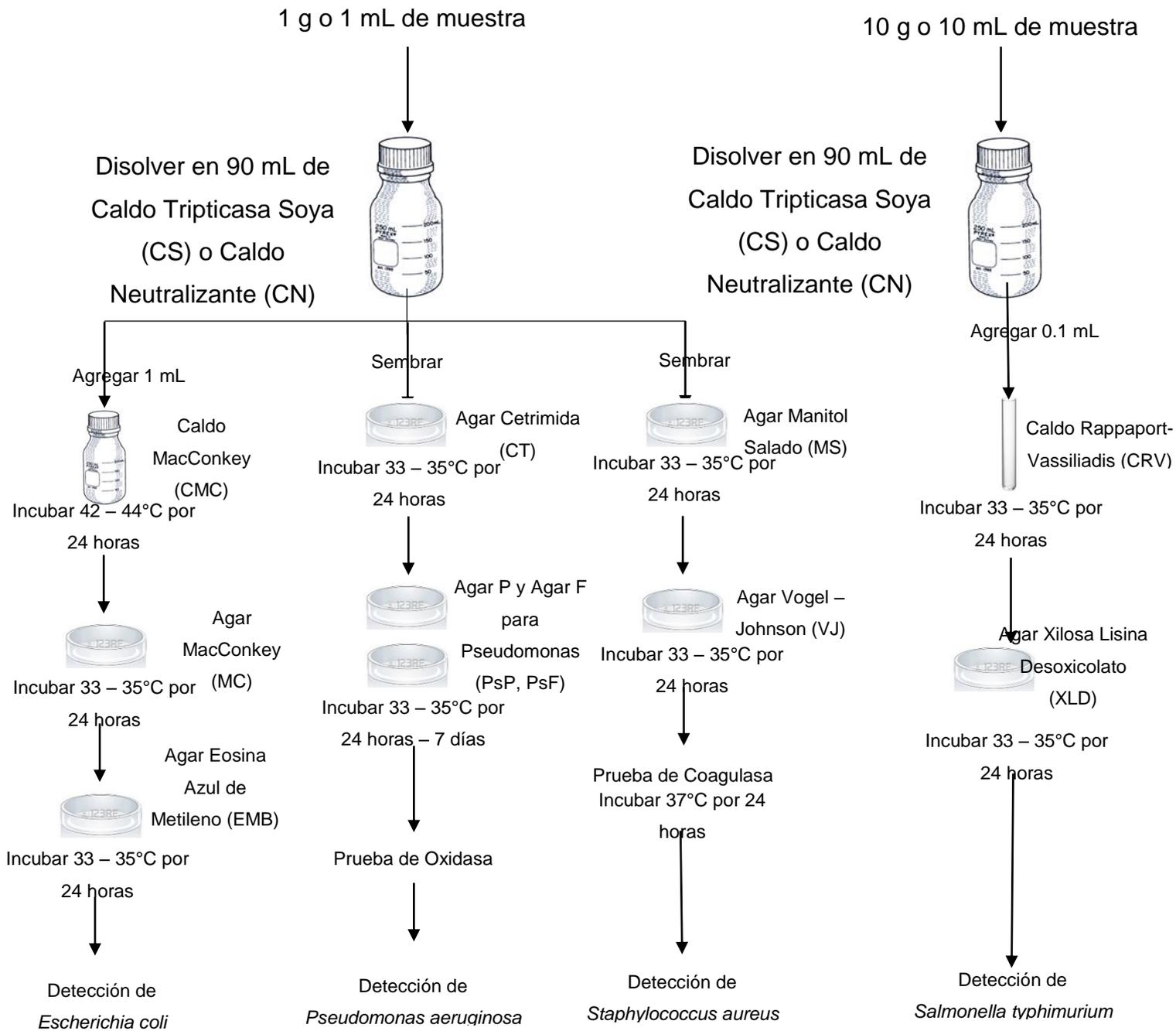
3.1.3 Normativa internacional

El principal ente que especifica la forma de trabajar en un laboratorio de control de calidad microbiológica de productos farmacéuticos es la OMS, la cual reitera la importancia de garantizar la calidad de productos, generando ensayos estandarizados y demostrados por cada laboratorio que los utilice, es decir, que para cada producto farmacéutico debe existir un protocolo de validación de técnicas que sustente que el producto permite la recuperación de microorganismos de referencia (OMS, 2013). Es por esta razón, que este organismo, le otorga la facultad a un grupo de profesionales que desarrollan cada año, en el compendio conocido como USP, los ensayos microbiológicos estandarizados y cómo validarlos. Para el caso de el examen microbiológico de productos no estériles, este se puede dividir en dos pruebas principales:

1. USP <61>: Prueba de recuento microbiano (USP <61>, 2016): consiste en la cuantificación de bacterias mesófilas recuperadas de un producto farmacéutico no estéril. Para cada producto existe un límite de microorganismos, entre bacterias y hongos, aceptable para su aprobación (Flujograma 1).
2. USP <62>: Prueba de microorganismos específicos (USP <62>, 2016): consiste en determinar la ausencia o presencia de microorganismos patógenos en productos farmacéuticos. Estos microorganismos se encuentran especificados para cada forma farmacéutica, es decir, para el caso de medicamentos orales, se debe demostrar la ausencia de *Escherichia coli*, en el caso de medicamentos que tienen contacto con piel como cremas, ungüentos y polvos se debe determinar la ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; asimismo, existen excepciones como el caso de la sulfadiazina de plata, cuya aplicación a pacientes con quemaduras le exige determinar la ausencia de los tres microorganismos mencionados anteriormente y de *Salmonella typhimurium*. Por lo tanto, las bacterias y hongos especificados dependen del uso que se le va dar al fármaco y de la patogenicidad de los microorganismos mencionados (Flujograma 2).



Flujograma 1: USP <61>: Examen Microbiológico de Productos no Estériles.



Flujograma 2: USP <62>: Prueba de Microorganismos Específicos.

Finalmente, la validación de ensayos microbiológicos se encuentra agrupada en parámetros que también son especificados en la normativa nacional. En la USP <1225>, se definen a los parámetros de exactitud, precisión, robustez, especificidad y linealidad, los cuales albergan cálculos estadísticos que permiten establecer una

comparación con un grupo control y obtener resultados confiables (USP <1225>, 2016).

3.1.4 Sulfadiazina de Plata

Este producto farmacéutico es conocido por su capacidad de regeneración en el tratamiento de heridas ocasionadas por quemaduras, cortes o incisiones graves, asimismo, es conocida su eficacia bacteriostática para impedir el auge del crecimiento de bacterias patógenos en heridas abiertas; su principio activo es la plata la cual es mundialmente utilizada en diferentes áreas de la salud (Int. Cons. 2012). Las empresas farmacéuticas producen ungüentos y cremas a base de este principio activo puesto a que se ha demostrado alta confiabilidad en la reepitelización de niños y adultos quemados y baja tasa de infección al usarse en heridas abiertas, por tal motivo, es indispensable una validación de análisis de este producto por su modo de uso (Solís, F. *et al* 2007).

Con respecto a las características microbiológica del producto, se destaca cierta actividad antimicrobiana, especialmente a bacterias que habitan la superficie de la piel y microorganismos oportunistas que puedan encontrarse en hospitales o centros de salud en general, no obstante, esto no impide que dichos microorganismos puedan introducirse en el organismo y proliferar en otra parte del cuerpo (Atiyeh, B. *et al* 2007). Para reforzar esta idea, existe evidencia que la sulfadiazina de plata puede inhibir el crecimiento de bacterias como *Staphylococcus aureus*, por sus características similares a bacterias habitantes de la piel, mas no a *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismo que forma parte de la flora bacteriana oportunista en hospitales y centros de salud (Alayo, G. 2013).

Los productos farmacéuticos son generalmente elaborados con moléculas de plata en estado catiónico, lo que le permite en bajas concentraciones actuar como microbicida o bacteriostático evitando la formación de biofilm de ciertas especies bacterianas, no obstante, su fabricación se realiza en área no clasificadas como estériles por lo que es imperativo su análisis de recuento microbiano y microorganismos específicos para confirmar estas características (Silver, S. 2003).

3.1.5 Bicarbonato de Sodio

Este compuesto se conoce mundialmente por su uso en diferentes áreas tanto de la salud, como ambiental, civil, industrial, etc. Esto se debe a sus características de tampón y de rápida disolución en diferentes medios líquidos. En el campo farmacéutico, su característica principal es su uso como coadyuvante para los síntomas de diferentes enfermedades relacionadas al sistema digestivo y respiratorio; así como también en la preparación de soluciones parenterales y de polvos orales (Romero, X. 2002). Desde el punto de vista analítico, se utiliza como solución tampón para la estabilidad de otros medicamentos, para la ejecución de ensayos físico-químicos y la preparación de medios de cultivo (Cedillo, E. *et al* 2007).

En cuanto a sus características microbiológicas, es utilizado en medio de cultivo y en la promoción del crecimiento de diferentes bacterianas, por lo que su contaminación con microorganismos es susceptible. No obstante, se puede demostrar que en ciertas concentraciones puede inhibir el crecimiento de levaduras y hongos por lo que es imprescindible descartar actividades inhibitorias de fármacos que utilicen bicarbonato de sodio como principio activo principal como el caso de polvos digestivos consumidos por vía oral (Gonzales, E. 2017).

3.1.6 Cepas certificadas

Los microorganismos están involucrados en casi todos los procesos industriales que fabrican productos que van a estar en contacto directo con la parte externa o interna del organismo, por lo tanto, es necesario analizar que dichos productos están libres de bacterias patógenas y que poseen un límite de bacterias que no modifique gravemente la flora bacteriana normal del ser humano, como es el caso de los medicamentos y fármacos no estériles (Abbasian, F. *et al* 2018). Esto apoya la idea que, en la validación de ensayos microbiológicos, es necesario el uso de cepas certificadas que te permitan identificar un microorganismo en particular y que posea características similares a las patógenas. Por tal motivo, la USP, te recomienda el uso de cepas certificadas por empresas extranjeras tal como la American Type Culture Collection (ATCC), la cual posee una gama de microorganismos utilizados en el campo farmacéutico y que son de referencia internacional (USP 39, 2016).

Las pruebas de promoción de crecimiento, validación de ensayos y verificación especificados en las normativas nacional e internacional son realizados con cepas certificadas cuyas características asemejan a bacterias patógenas y a microorganismos ambientales que pueden contaminar o estar en contacto directo con los fármacos producidos (ATCC, 2014). En un ensayo de validación es importante la robustez y especificidad de las cepas utilizadas, por lo que el uso de diferentes microorganismos, otorga variabilidad al ensayo y permite evaluar el comportamiento del producto con respecto a la cepa, es así que, se utilizan cepas patógenas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Candida albicans*; así como cepas ambientales tales como *Bacillus subtilis* y *Aspergillus brasiliensis* (ATCC, 2017). Asimismo, la identificación de estas cepas va ligada a sus características bioquímicas, de manera tal que se puedan utilizar medios de cultivo o métodos moleculares que faciliten la automatización de un sistema de validación, es decir, que cuando se realice un ensayo de validación se permita saber en pocos pasos que cepas han sido inhibidas por el producto y cuales han proliferado (Sakhno, N. *et al* 2016).

Por último, el mantenimiento de cepas certificadas es un punto indispensable para el desarrollo de ensayos microbiológicos, ya que el hecho de cultivar en diferentes ocasiones una cepa de una misma fuente puede conllevar al desarrollo de mutaciones, alteraciones bioquímicas o muerte celular prematura de los microorganismos, por ello, de acuerdo a las empresas que comercializan este tipo de cepas, son necesarias máximo cinco subcultivos a partir de la fuente o cepa madre, para evitar alteraciones en el microorganismo (ATCC, 2003). Además, las cepas principalmente utilizadas, debido a su patogenicidad y predominancia en diferentes tipos de ambiente, en un ensayo de validación son (Perilla, L. 2013):

1. *Escherichia coli* ATCC 8739

Este microorganismo es comúnmente encontrado en los órganos inferiores del sistema digestivo, es gram negativo, y puede crecer en ambientes aerobios y anaerobios, a una temperatura de 37°C; su uso en investigación y pruebas de diagnóstico es diverso y mundialmente difundido (Manasa, D. 2016). La caracterización de la bacteria se basa en sus propiedades bioquímicas y moleculares; es así que, incluso, puede ser utilizada por metabolitos secundarios

producidos en la formación de biopelículas, el cual, también otorga una visión general de la actividad patogénica de algunas subespecies que afectan el sistema digestivo mediante procesos de adherencia y liberación de toxinas (Hufnagel, D. *et al*/2015). La importancia de esta cepa en el sector farmacéutico está relacionado a su ciclo de vida, ya que la vía de infección común es oral; por tal motivo, los métodos de detección se basan en las propiedades bioquímicas (lactosa positivo, gram negativa) o en el uso de herramientas de biología molecular (secuenciamiento, aislamiento de ADN), para lo cual se dispone de diversas bases de datos que especifican cual es la cepa de mayor incidencia encontrada en productos farmacéuticos posiblemente contaminados (Keseler, I. *et al* 2010).

2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Se define como bacteria gram positiva de forma cocoide, que habita como comensal en la piel humana, pero puede tornarse altamente patógena en contacto con las capas mucosas. Posee un amplio rango de infección en diferentes órganos, tales como pulmones, corazón, y huesos; lo cual indica su capacidad de colonización y evasión del sistema de inmunológico (Tong, S. *et al* 2015). Su caracterización bioquímica se basa en la degradación del manitol y el crecimiento en altas concentraciones de sal, así como la producción de coagulasa la cual utilizada como estrategia de supervivencia; por otro lado, la detección molecular consiste en el uso de secuencias globalmente utilizadas, como ARN 16S, no obstante, para la correcta caracterización de bacterias patógenas se puede optar por utilizar genes de resistencia, ya que, esta cepa, en su genoma puede albergar multiresistencia a antibióticos (MRSA) y la sensibilidad a meticilina (MSSA), lo que agrupa a esta especie en dos poblaciones importantes (El-Adhami, W. *et al* 1997). En la industria farmacéutica, es importante, establecer un plan de acción al encontrar esta especie de bacteria, debido a su rápida colonización e impregnación en los productos farmacéuticos; por ello, la incidencia de *S. aureus* dependerá, en mayor medida, de la constante limpieza y saneamiento de las áreas de producción y del personal que fabrica los fármacos (Okunlola, A. *et al* 2007).

3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Las características más importantes de esta cepa residen en su genoma, el cual alberga una gran cantidad de genes de tolerancia a ambientes extremos y de resistencia a antibióticos; en la eliminación de la competencia de otras poblaciones bacterianas; y en la secreción de toxinas, proteínas que otorgan energía, y ácidos nucleicos lo que indica una alta tendencia a la transferencia genética horizontal intraespecífica (Dara, F. 2012). Asimismo, corresponde a un microorganismo gram negativo, productor de pigmentos como la piocianina, el cual es utilizado para eliminar competencia interespecífica, y la formación de biopelículas, la cual le permite agravar su patogenicidad en la mucosa respiratoria, debido al quórum sensing que genera procesos sinérgicos entre las bacterias para la producción de toxinas y aislamiento de cepas puras (Badi, B. *et al* 2017). En el control de calidad de fármacos, su presencia es ampliamente distribuida y mantenida por el uso de agua contaminada o la incorrecta conservación de productos farmacéuticos acuosos o con alto porcentaje de agua en su composición (cremas, gotas, jarabes, etc.), debido a la formación de biopelículas, es posible encontrar esta contaminación utilizando técnicas moleculares en el contenido del producto o aislarlo en medios de cultivo selectivos (Vijayakumar, R. *et al* 2011).

4. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Esta cepa representa un modelo para el estudio de patógenos intracelulares. Forma parte de un grupo de bacterias gram negativas, aerobias facultativas, patógenas del sistema digestivo y respiratorio, cuyo éxito patogénico depende de su capacidad invasiva y la producción de toxinas las cuales lisan las moléculas inmunológicas innatas e inducen apoptosis en células hospederas (Garai, P. *et al* 2012). Actualmente, esta bacteria es utilizada para estudios en genómica y resistencia antimicrobiana debido a su sofisticado sistema de evasión del sistema inmunológica y su agresiva colonización en especies animales comerciales y humanos; la variabilidad genética de los serovares y subespecies es la estrategia de supervivencia ante fármacos de amplio espectro y ambientes extremos (Salvatierra, G. *et al* 2018). El rol de detección de esta cepa en industrias farmacéuticas está asociado a la presencia de materia fecal o mucosas en las

áreas de producción, ya que su nicho ecológico es exclusivamente patogénico. Por este motivo, su identificación está relacionada a productos farmacéuticos que son utilizados en contacto directo con heridas abiertas o productos nasales, y está asociada a la detección de otros patógenos oportunistas como *E. coli* (Rao, V. *et al* 2008).

5. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Es un microorganismo gram positivo, utilizado como modelo biológico en estudios de contaminación ambiental, resistencia a ambientes extremos y producción de esporas; es conocido, por su habilidad de tolerar condiciones adversas como presión, salinidad y calor (Polka, J. *et al* 2014). Asimismo, es una cepa utilizada en el campo de la biología molecular, por servir como modelo en la anotación de genomas de otras bacterias ambientales; en las características principales de la cepa, destacan proteínas involucradas en silenciamiento génico, producción de esporas, degradación de materia orgánica y producción de metabolitos secundarios (Borris, R. *et al* 2018). La presencia de esta bacteria en la industria farmacéutica es utilizada como bioindicador de contaminación ambiental, en el caso, de áreas estériles o máquinas, indica que existen fallas en las buenas prácticas de manufactura o en la infraestructura del área de producción, por tal motivo, es indispensable tomar acciones ante estos hallazgos (Gad, G. *et al* 2010).

6. *Candida albicans* ATCC 10231

Especia que forma parte del grupo de levaduras altamente patógenas, gram positivo, que comparte características estructurales básicas con hongos desarrollados por la producción de pseudo-hifas. Su patogenicidad es invasiva y reside, principalmente, en la mucosa vaginal y bucal, además, de presentar resistencia a varios antifúngicos y antibióticos de amplio espectro; es comúnmente encontrada en hospitales y puede ocasionar enfermedades asintomáticas (Dadar, M. *et al* 2018). Por otro lado, se realizan estudios de genómica en este microorganismo, con el fin de detectar funciones hipotéticas de genes que ayuden a la producción de antifúngicos, además, se consideran las estructuras anatómicas

que ayudan a la patogenicidad de la bacteria (Quintana, S. *et al* 2017). En la industria farmacéutica la incidencia de la bacteria está basada en la obtención de cepas multiresistentes a drogas como clindamicina, nistatina, etc., principalmente en productos vaginales como cremas y óvulos (Goyal, R. *et al* 2016).

7. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Es el único modelo eucariótico utilizado en el presente trabajo de tesis debido a su importancia como indicador de contaminación ambiental. Pertenece a la sección *Nigri* de las especies de *Aspergillus*, la cual está globalmente caracterizada como modelo biológico para el estudio de estructuras filamentosas, estrategias de esporulación y diseminación en ambientes húmedos (Krull, R. *et al* 2010). Asimismo, tiene un gran impacto positivo en la producción de metabolitos secundarios los cuales son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos y fármacos; estas investigaciones analizan la genómica y metabolómica de esta especie y demás organismos pertenecientes a la sección *Nigri* con el fin de encontrar similitudes en los diferentes taxa (Vesth, T. *et al* 2018). La industria farmacéutica utiliza esta especie para detectar la contaminación de hongos en sus productos, debido a la alta producción de metabolitos secundarios de esta especie, es capaz de degradar los compuestos químicos y las características físicas de los productos evaluados, lo cual afecta estudios de estabilidad y almacenamiento (Aghili, S. *et al* 2016).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar la validación del Examen Microbiológico del Bicarbonato de Sodio por el método de filtración y Sulfadiazina de Plata por el método de vertido en placa según USP vigente.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer la estandarización los inóculos de las cepas microbianas a utilizar en la validación.
- Cumplir con la promoción de Crecimiento de los medios utilizados en la Validación.
- Diseñar y realizar las pruebas de recuento microbiano y de microorganismos específicos de Bicarbonato de Sodio por el método de filtración y de Sulfadiazina de Plata por el método de vertido en placa.
- Calcular los parámetros de la validación de examen microbiológico de productos no estériles: exactitud, precisión, especificidad, robustez.

V. HIPÓTESIS

Si se logra validar el examen microbiológico del Bicarbonato de Sodio y de Sulfadiazina de Plata se podrá asegurar adecuadamente la calidad de estos productos farmacéuticos.

5.1 Lugar donde se realizará

El trabajo de tesis fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Control Microbiológico de la industria farmacéutica Medifarma S.A. El laboratorio cuenta con ambientes óptimos con controles microbiológicos ambientales realizados periódicamente, con la disponibilidad de equipos adecuados para el trabajo (cabina de bioseguridad, incubadoras, baño maría), con cepas bacterianas certificadas y la adquisición de materiales vigentes y probados antes de su uso (medios de cultivo, placas, material de vidrio, uniformes). Además, el laboratorio se encuentra acreditado en BPL por la Dirección General de Medicamentos y Drogas (DIGENMID).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se aplicó en el rubro de la microbiología en la validación de métodos de control de calidad en fármacos. El diseño de la investigación estuvo basado en la normativa internacional USP, en el desarrollo de aptitud de método correspondiente a los capítulos <61> y <62>, y al desarrollo de validaciones correspondiente al capítulo <1225>. Asimismo, con los conocimientos de microbiología aplicada y química de productos farmacéuticos.

6.1 Participantes

El proyecto de tesis fue diseñado y redactado por el autor, y realizado por el autor con el apoyo del personal del laboratorio de Control Microbiológico de Medifarma S.A.

6.2 Instrumentos de la investigación

En la investigación se utilizaron los equipos e insumos disponibles en el laboratorio:

Equipos: Autoclave, incubadora, cabina de bioseguridad, baño maría.

Insumos: Mandiles descartables, guantes estériles, placas estériles, membranas de filtración 0.45 µm, equipos de filtración, sistema de vacío.

Medios de cultivo: Agar Tripticasa Soya (TSA), Agar Dextrosa Sabouraud (DSA), Caldo Soya Tripticasa (CS), Caldo MacConkey (CMC), Agar MacConkey (MC), Agar Manitol Salado (MS), Agar Cetrimida (CT), Agar Vogel-Johnson (VJ), Caldo Cerebro-Corazón (BHB), Agar P para Pseudomonas (PsP), Agar F para Pseudomonas (PsF), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), Caldo Rappaport-Vasilliadis (CRV), Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).

Reactivos: Bactident Oxidasa®, Reactivo de Coagulasa®

6.3 Población y muestra

La población empleada fueron microorganismos certificados para los ensayos de validación: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Candida albicans* ACC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. En cuanto a la muestra, se trataron de tres lotes, fabricados en una industria farmacéutica, de sulfadiazina de plata y bicarbonato de sodio.

6.4 Operalización de las variables

De acuerdo al capítulo <1225> de la USP, se tomaron en cuenta las siguientes variables para la validación de métodos microbiológicos:

- **Exactitud:** Se evaluó obteniendo el porcentaje de recuperación en la prueba de recuento microbiano de ambos productos. Para ello, se comparó la cantidad de colonias obtenidas en el grupo de prueba, que consiste en la inoculación de la cepa en frascos con muestra, con respecto al grupo control, que consiste en la inoculación de la cepa en frasco sin muestra. El promedio del porcentaje de recuperación, fue el valor de la exactitud.
- **Precisión:** Se evaluó calculando la desviación estándar de los conteos de colonias obtenido de cada repetición de las pruebas de recuento microbiano para ambas muestras. La congruencia en los datos con respecto a la repetitividad del análisis fue el valor de la precisión.
- **Especificidad:** Se evaluó de forma cualitativa tomando en cuenta la detección de los microorganismos específicos de cada producto validado. Las pruebas de promoción de crecimiento en comparación con la prueba de microorganismos específicos resultaron en el valor de la especificidad.
- **Robustez:** Se evaluó mediante los resultados de conteo de colonias obtenido en 3 tiempos diferentes: 72 horas, 96 horas y 120 horas. La diferencia entre los conteos obtenidos no debe exceder un 15%, asimismo, se calculó la desviación estándar de cada tiempo de conteo el cual fue comparado con el conteo inicial.

VII. PROCEDIMIENTOS

7.1 Estandarización de las cepas de prueba

La estandarización de las cepas de prueba, es un diseño propio cumpliendo los lineamientos de la USP 39. Se utilizaron las cepas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella typhimurium* ACC 14028, las cuales fueron adquiridas por la empresa Medifarma S.A. Para cada una de las cepas se utilizó un cultivo de no más de 24 horas de incubación en el caso de las bacterias y no más de 3 días en el caso de los hongos. Se procedió a cosechar cada cultivo y colectarlo en un frasco con 100 mL de Buffer Fosfato Diluido pH 7.0 (B7) estéril, denominándose como suspensión madre. Se realizaron diluciones sucesivas agregando 1 mL de la suspensión madre en un frasco con 99 mL de B7, este proceso se realizó 4 veces, obteniendo así diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-9} . Posteriormente, del frasco correspondiente, se extrajo 1 mL para las diluciones 10^{-8} y 10^{-6} ; y 100 μ l para las diluciones 10^{-7} y 10^{-9} , las cuales se colocaron en placas Petri estériles por triplicado para cada dilución. Para el caso de las bacterias se cultivaron en Agar Tripticosa Soya (TSA), y se incubaron a 30-35°C por 3 días; y los hongos se cultivaron en Agar Sabouraud Dextrosa 4% (DSA), y se incubaron a 20 – 25°C por 5 días. Al finalizar los periodos de incubación se contabilizaron la cantidad de colonias obtenidas (UFC) y se optó por la dilución que contenga de 10 – 100 UFC, por cada cepa, para la realización de la validación. Este procedimiento, en general, se realizó por triplicado y se evaluó la distribución de los datos mediante análisis de diferencias significativas para muestras independientes.

7.2 Prueba de promoción de crecimiento de los medios de cultivo

La prueba de promoción de crecimiento se realizó de acuerdo a las especificaciones de la USP 39, para cada uno de los medios de cultivos utilizado en las pruebas de

validación de los dos productos evaluados. Para el caso de los medios de cultivo líquidos se inoculó de 10 – 100 UFC según el microorganismo que corresponde al medio de cultivo, y se verificó el crecimiento o inhibición de la cepa. En el caso de los medios de cultivo sólidos, se inoculó en placas estériles de 10 – 100 UFC del microorganismo y se evaluó el crecimiento por conteo de colonias. La cantidad de UFC recuperada no debe ser menor al 50% ni exceder el 200% con respecto al control. El control consiste en los resultados obtenidos de la estandarización de cepas.

7.3 Prueba de Recuento Microbiano y Prueba de Microorganismo específico del Bicarbonato de Sodio por el método de Filtración.

Para la prueba de recuento microbiano del Bicarbonato de Sodio se realizará por el método de filtración por membrana de acuerdo a la normativa USP 39, para ello se pesó 10 g del producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de B7 a continuación, bajo mechero, se procedió a filtrar 10 mL de la solución en equipos de filtración estériles. El filtrado se enjuagó, en tres repeticiones, con 100 mL de B7 estéril. En el último enjuague se inoculó aproximadamente de 10 – 100 UFC de las cepas *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Finalmente, la membrana de filtración se colocó en una placa de TSA, para el recuento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, la cual se incubó a 30-35°C por 3 días; y en una placa de DSA, para el recuento de las cepas *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, la cual se incubó a 20-25°C por 5 días. Al final de cada periodo de incubación se contaron las colonias obtenidas para cada cepa. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Para la prueba de microorganismo específico, en caso de Bicarbonato de Sodio se realizó con la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739, de acuerdo a la normativa vigente. En este caso, se pesó 1 g del producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de B7 estéril. Se procedió a filtrar todo el contenido del frasco de forma aséptica. El filtrado se enjuagó en tres repeticiones, con 100 mL de B7 estéril. En el último enjuague se

inocularon aproximadamente de 10 – 100 UFC de la cepa mencionada anteriormente. Finalmente, se retiró la membrana de filtración cuidadosamente, y se colocó en un frasco con 90 mL de Caldo Trypticase Soya (CS) estéril, el cual se incubó a 30-35°C por 24 – 28 horas. Posteriormente, se extrajo 1 mL del CS y se inoculó en 100 mL de Caldo MacConkey (CMC), el cual se incubó a 42 – 44°C por 24 horas. A continuación, con un asa de siembra, se sembró, el crecimiento del CMC, en una placa con Agar MacConkey (MC), y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Al observarse un crecimiento típico de *E. coli*, se confirmó sembrando la cepa en una placa con Agar EMB (EMB), el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 horas.

7.4 Prueba de Recuento Microbiano y Prueba de Microorganismo específico de Sulfadiazina de Plata por el método de Vertido en placa.

La prueba de recuento microbiano de Sulfadiazina de Plata se realizó por el método de vertido en placa de acuerdo a la USP 39, para ello se pesó 10 g del producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de CS estéril. A cada frasco se inocularon de 10 – 100 UFC de las cepas *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. A continuación se colocó 1 mL de cada frasco en 2 placas estériles, se procedió a agregar TSA, para el recuento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, la cual se incubó a 30-35°C por 3 días; por otro lado, se colocó 1 mL de cada frasco en 2 placas estériles, en donde se agregó DSA, para el recuento de las cepas *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, la cual se incubó a 20-25°C por 5 días. Al final de cada periodo de incubación se contaron las colonias obtenidas y calculando un promedio general por cepa. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Para la prueba de microorganismos específicos, en caso de Sulfadiazina de Plata, se realizó con las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella typhimurium* ACC 14028. Se efectuaron los siguientes procedimientos para cada una de las cepas:

- *P. aeruginosa*: Se pesó 1 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de CS estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. Con un asa de siembra, se sembró, del CS, a una placa con Agar Cetrimida (CT), y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Luego de obtener colonias típicas, se sembró una de las colonias resultante en una placa con Agar P para Pseudomonas (PsP) y Agar F para Pseudomonas (PsF), y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Asimismo, para una de las colonias obtenidas de la placa de CT se utilizó el reactivo Bactident Oxidasa®, para confirmar la presencia de la bacteria.
- *S. aureus*: Se pesó 1 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de CS estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. Con un asa de siembra, se sembró, del CS, en una placa con Agar Manitol Salado (MS), y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Luego de obtener colonias típicas, se sembró una colonia resultante en una placa con Agar Vogel-Johnson (VJ) y se incubó a 30-35°C por 24 horas. Asimismo, se sembró una colonia en un tubo con Caldo Cerebro Corazón (BHB), y se incubó a 30-35°C por 24 horas. Simultáneamente, se incubó una cepa de *S. aureus* en el mismo medio como control positivo. Se utilizó el Reactivo de Coagulasa® para ambos tubos, agregando 100 µL del medio de cultivo más la cepa y 300 µL del reactivo en tubos limpios y estériles, se incubó la reacción a 37°C por 24 horas para la confirmación de la cepa bacteriana.
- *E. coli*: Se pesó 1 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de CS estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. Posteriormente, se extrajo 1 mL del CS y se inoculó en 100 mL de Caldo MacConkey (CMC), el cual se incubó a 42 – 44°C por 24 horas. A continuación, con un asa de siembra, se sembró del crecimiento del CMC en una placa con Agar MacConkey (MC), y se incubó a 30 – 35°C por 24 horas. Luego de obtener un crecimiento típico de *E. coli*, se confirmó sembrando la cepa en una placa con Agar EMB (EMB), el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 horas.
- *S. typhimurium*: Se pesaron 10 g de producto y se disolvió en un frasco con 90 mL de CS estéril, el cual se incubó a 30 – 35°C por 24 – 48 horas. A continuación, se extrajeron 100 µL del frasco anterior, y se inocularon en un

tubo con 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis (CRV), el cual se incubó a 30-35°C por 24 horas. Finalmente, con un asa de siembra, se sembró del CRV en una placa con Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), la obtención de colonias típicas confirmó la presencia de la cepa bacteriana.

7.5 Técnicas para el procesamiento de la información

Con los datos obtenidos de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos de ambos productos se calcularon las variables mencionadas anteriormente en este trabajo con ayuda de Microsoft Excel y SPSS

2.1

VIII. RESULTADOS

8.1 Estandarización de cepas

En este procedimiento se obtuvo un conteo de bacterias uniforme en las últimas diluciones realizadas (10^{-7} – 10^{-9}), obteniendo un procedimiento estandarizado para la preparación de las suspensiones microbianas (Ver Anexo - Tabla 1).

Asimismo, el promedio entre 10 – 100 UFC de los microorganismos resultó en la dilución 10^{-8} , sin diferencias significativas, en las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ($t = 0.89$), *Pseudomonas aeruginosa* ATC 9027 ($t = 0.83$), *Escherichia coli* ATCC 8739 ($t = 0.51$), *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ($t = 0.5$). Por otro lado, para el caso de microorganismos esporulados y hongos, el promedio de 10 – 100 UFC se obtuvo en la dilución 10^{-7} : *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($t = 0.52$), *Candida albicans* ATCC 10231 ($t = 0.08$) y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 ($t = 0.84$) (Gráfico 1, Ver Anexo - Tabla 2). Por otro lado, se realizó la promoción de crecimiento de los medios de cultivo utilizados en la estandarización de cepas, tomando en cuenta como grupo de prueba (GP), a un lote de medio de cultivo preparado anteriormente (Ver anexo - Tabla 3). En este análisis se obtuvieron resultados aceptables para los medios de cultivos sólidos con un porcentaje de recuperación de microorganismos entre el 50% y 200% con respecto al grupo control (GC).

8.2 Validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de recuento microbiano de Sulfadiazina de Plata por el método de vertido en placa

Los resultados demostraron que el producto no inhibe el crecimiento de bacterias ni hongos con la técnica normalizada. Del mismo modo, se presentan los datos obtenidos para el cálculo de las variables mencionadas anteriormente.

a. Exactitud

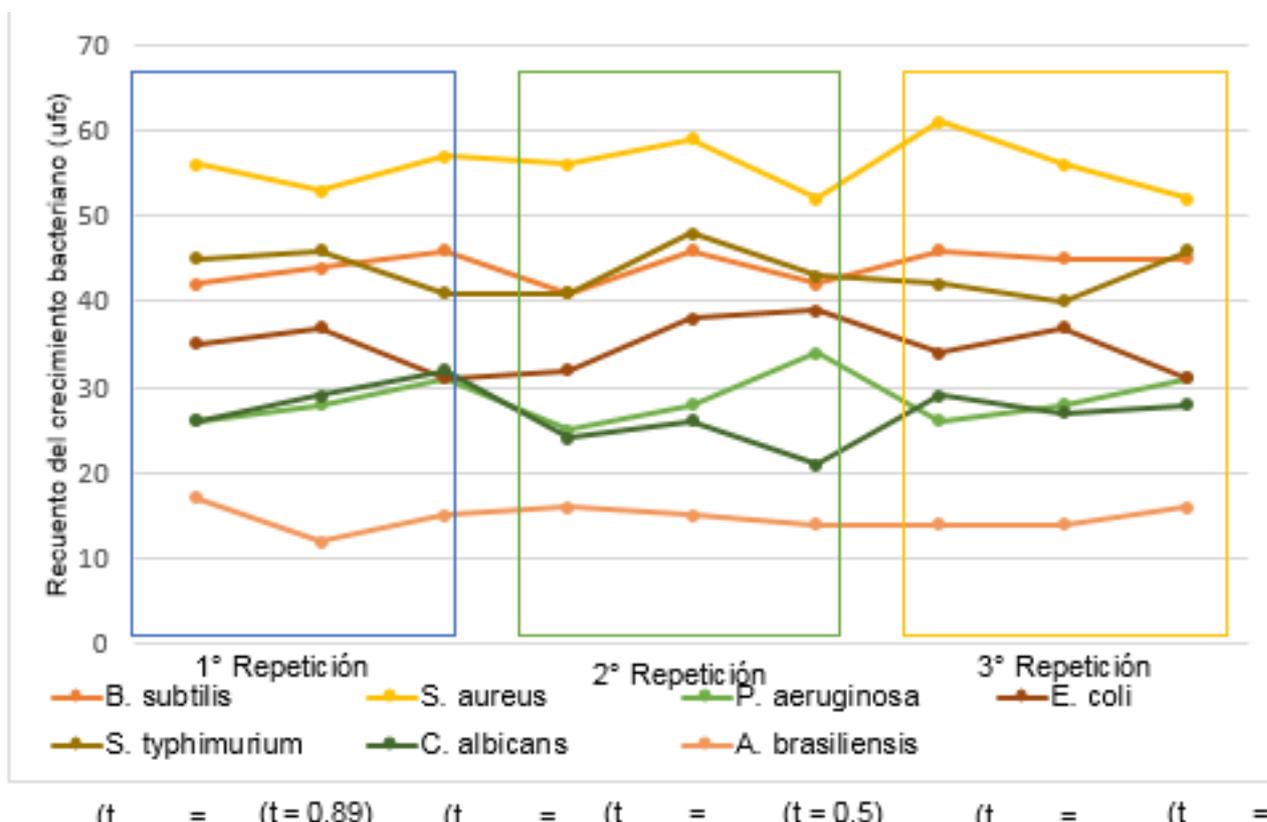
Los valores de la exactitud se mantuvieron en un factor de 2 con respecto al control, es decir, que no fueron menor al 50% ni excedieron el 200% de recuperación de los microorganismos analizados (Ver Anexo - Tabla 4). Además, se puede observar gráficamente que los porcentajes de recuperación obtenidos son similares en cada cepa para los 3 lotes de muestra que se utilizó en la validación (Gráfico 2), por lo tanto, las suspensiones de trabajo resultantes de la estandarización de cepas han sido correctamente preparadas.

b. Precisión

En el caso de la precisión se analizaron los datos de los tres lotes de forma dependiente, obteniendo ausencia de diferencias significativas para las cepas evaluadas de acuerdo al valor de la prueba “t” de Student. Por consiguiente, la muestra evaluada no produce efectos negativos en el crecimiento de microorganismos (Gráfico 3, Ver Anexo - Tabla 5).

Asimismo, la precisión permitió determinar que los microorganismos utilizados han correspondido a cepas puras sin variabilidad biológica debido a la ausencia de diferencias en su crecimiento tanto en el grupo de prueba (GP) como en el grupo control (GC). Este resultado es importante para verificar la confiabilidad de la validación.

GRÁFICO 1 Recuento de la estandarización de las cepas prueba en las diluciones de trabajo seleccionadas



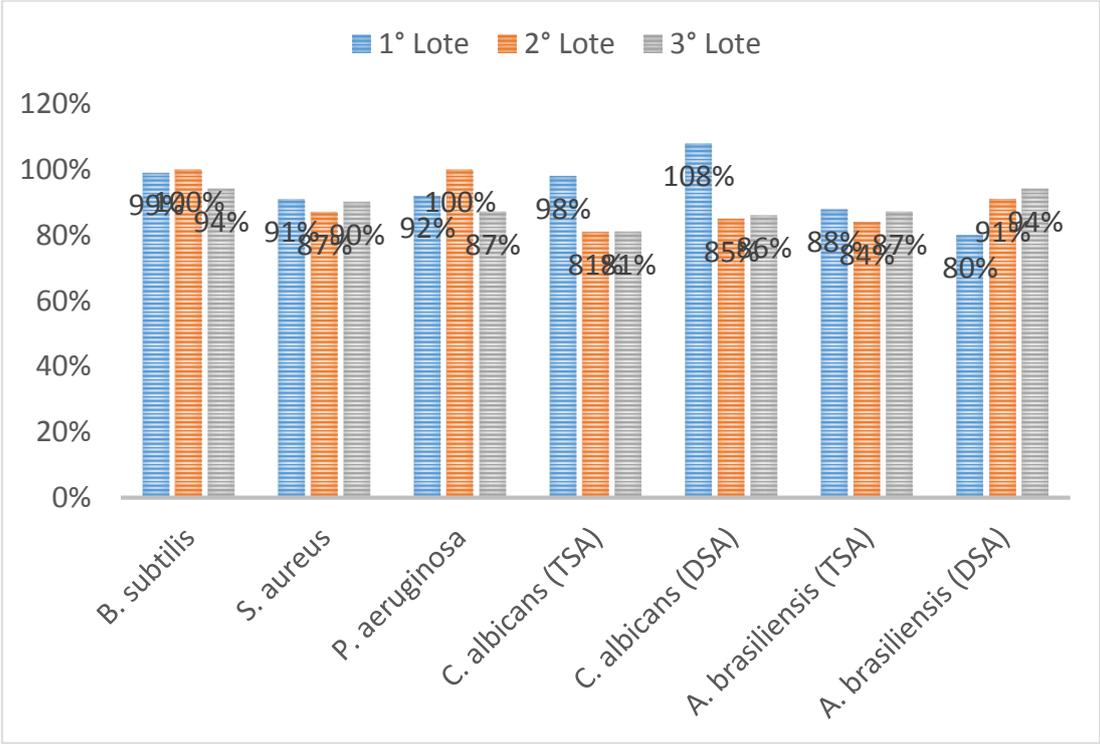
c. Robustez

Se evaluaron los datos obtenidos del crecimiento bacteriano y de hongos durante 72 h, 96 h y 120 h respectivamente. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas en la recuperación de microorganismos durante este periodo tiempo y que los valores del grupo de prueba son similares a los del grupo control (Ver Anexo - Tabla 6.1); por lo tanto, se puede deducir que la muestra evaluada no genera un efecto bactericida o bacteriostático, ni tampoco es un medio propicio para el sobrecrecimiento de microorganismo (Ver Anexo - Tabla 6.2).

Debido a que la sulfadiazina de plata es un suplemento utilizado en productos farmacéuticos, este resultado permite elucidar de qué manera puede utilizarse en un proceso de producción. Asimismo, los resultados obtenidos de las pruebas de promoción de crecimiento de los medios de cultivo utilizados en la validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de recuento microbiano de sulfadiazina de plata demuestran que, al igual que los medios utilizados en la

estandarización de cepas, se obtuvo como porcentaje de recuperación entre 50 y 200% de conteo de unidades formadoras de colonias; mientras que, en el caso de medios de cultivo líquidos, se observó el crecimiento por medio de turbidez o cambios de color (Ver Anexo - Tabla 7).

GRÁFICO 2 Porcentajes de recuperación de microorganismos de los tres lotes evaluados de sulfadiazina de plata



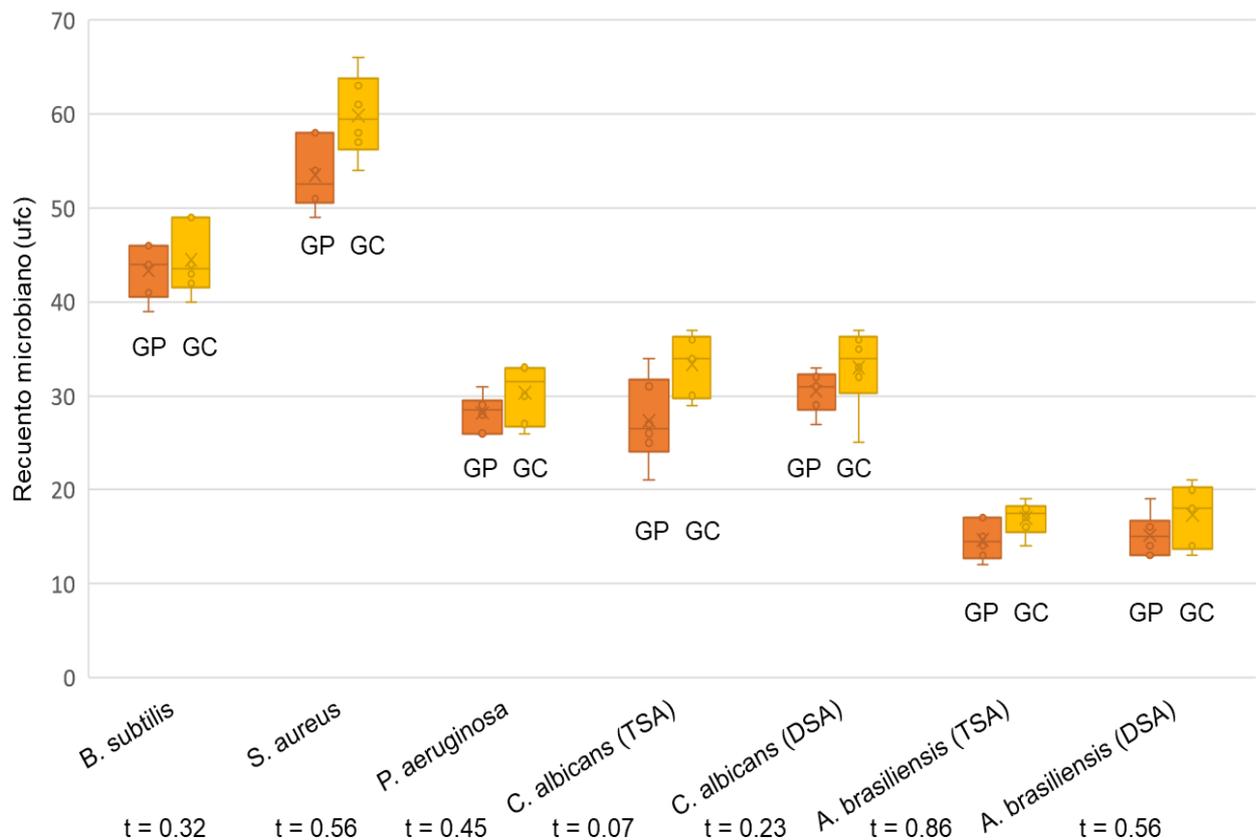
8.3 Validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de microorganismos específicos de Sulfadiazina de Plata por el método de vertido en placa

Los resultados demostraron que la muestra evaluada no inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos; sin embargo, su periodo de incubación en medio de enriquecimiento es mayor a 24 h en el caso de *E. coli* ATCC 8537, *S. aureus* ATCC 6538 y *S. typhimurium* ATCC 14028, lo que significa que el microorganismo necesita mayor tiempo de incubación que el del método normalizado para poder ser identificado en la muestra.

a. Especificidad

Los resultados se observaron a las 24 h, según el método normalizado, no obstante, no se observó crecimiento en los medios de cultivo selectivo para *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*. Por lo tanto, se incubaron los medios de cultivo por más tiempo para promover el crecimiento de los microorganismos, obteniendo una recuperación con las características correspondientes a cada cepa luego de 48 h de incubación (Ver Anexo - Tabla 8).

GRÁFICO 3 Resultados de la precisión del crecimiento microbiano a sulfadiazina de plata.



b. Robustez

De acuerdo a la información anterior, se puede demostrar que los microorganismos evaluados mantienen sus características de crecimiento típicas durante las 72 h que dura la incubación; es decir que la muestra no produce la reducción de la población del microorganismo ni provoca cambios en su estructura bioquímica. Sin embargo, en el caso de *S. aureus* se puede observar la ausencia del crecimiento a las 24 h después de haberse incubado la muestra con la cepa en el medio de enriquecimiento y subcultivarse en los medios MS y VJ; el crecimiento se observa a partir de las 48 h de incubación. Del mismo modo, ocurre con la cepa *S. typhimurium*, en los medios CRV y XLD. Por tal motivo, este resultado valida que la muestra necesita un tiempo de incubación de 48 h para permitir el crecimiento de cualquier posible cepa patógena que pueda haber contaminado un producto con sulfadiazina de plata.

Asimismo, en los resultados de la promoción de crecimiento de los medios de cultivo, utilizados en la validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de microorganismos específicos de sulfadiazina de plata, se demuestra su

correcto funcionamiento. En este caso, debido a que se utilizaron medios de cultivo selectivos sólidos y líquidos, se utilizan cepas que tienen un crecimiento típico en el medio, y, en algunos casos, cepas que son inhibidas por las propiedades bioquímicas del medio de cultivo. La selección de cepas se realizó de acuerdo al listado de la USP 39 (Ver Anexo - Tabla 9.1 y 9.2).

8.4 Validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de recuento microbiano de Bicarbonato de sodio por el método de filtración por membrana.

Los resultados de la validación demostraron que la muestra de bicarbonato de sodio no inhibe el crecimiento de los microorganismos evaluados y que los parámetros obtenidos se encuentran dentro del rango permitido.

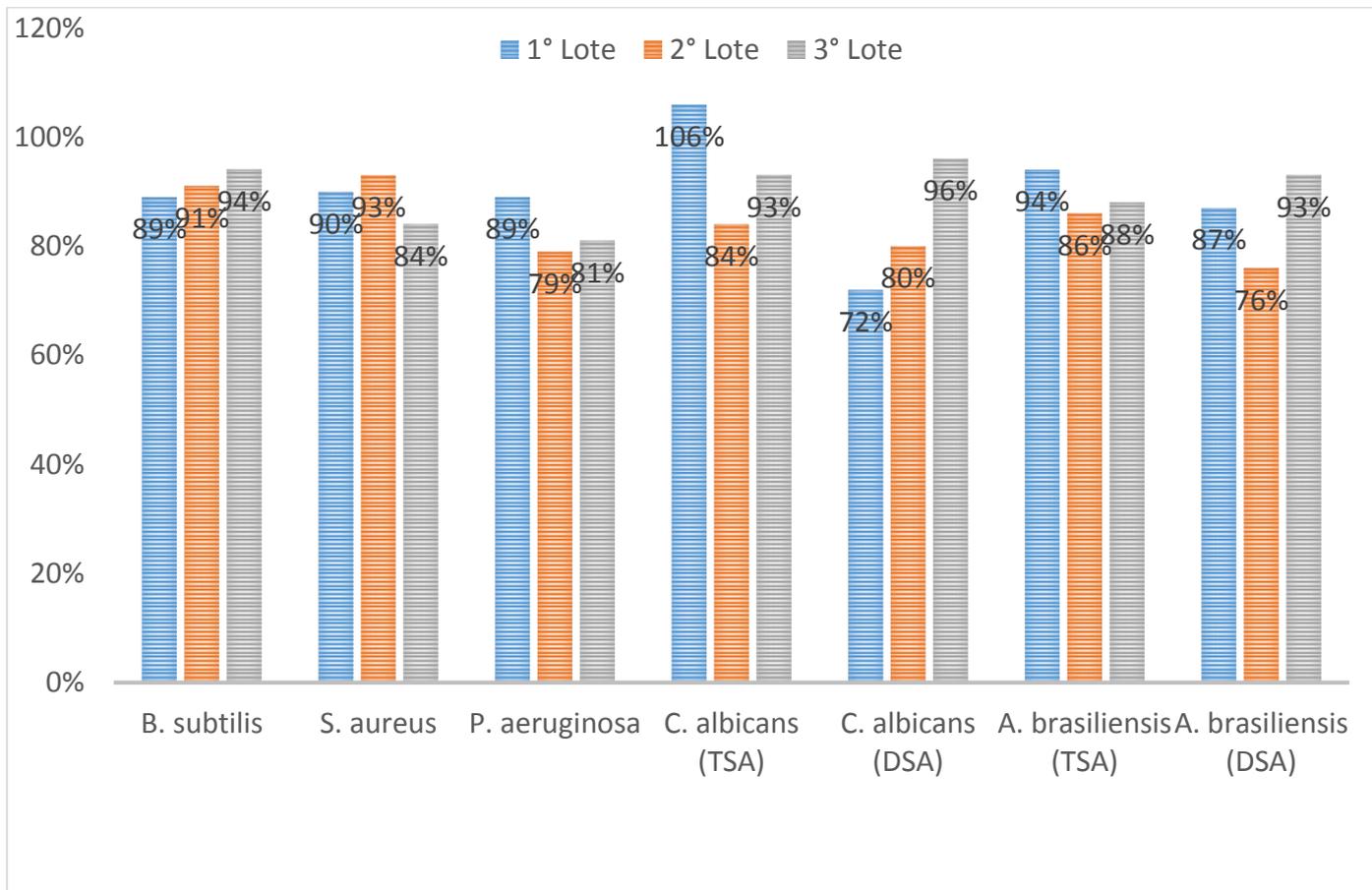
a. Exactitud

La recuperación de microorganismos no es menor que el 50% y no excede el 200% con respecto al recuento del grupo control (Ver Anexo - Tabla 10). Asimismo, se demuestra gráficamente que los datos presentan leves diferencias en el porcentaje de recuperación (Gráfico 4), lo que demuestra la estabilidad del crecimiento microbiano en el grupo de prueba.

a. Precisión

En el caso del bicarbonato de sodio, el resultado de recuento de microorganismos por el método de filtración obtuvo un valor “t” mayor a 0.05, lo que indica que los datos obtenidos no presentan diferencias significativas en las tres pruebas realizadas (Gráfico 5). No obstante, existen datos cercanos al límite, como en el caso de *A. brasiliensis* y *S. aureus*, los cuales corresponden a los promedios más bajo y más alto respectivamente, por lo que se deduce que los datos tienden a ser más variables (Ver Anexo - Tabla 11)

GRÁFICO 4 Porcentajes de recuperación de microorganismos de los tres lotes evaluados de bicarbonato de sodio

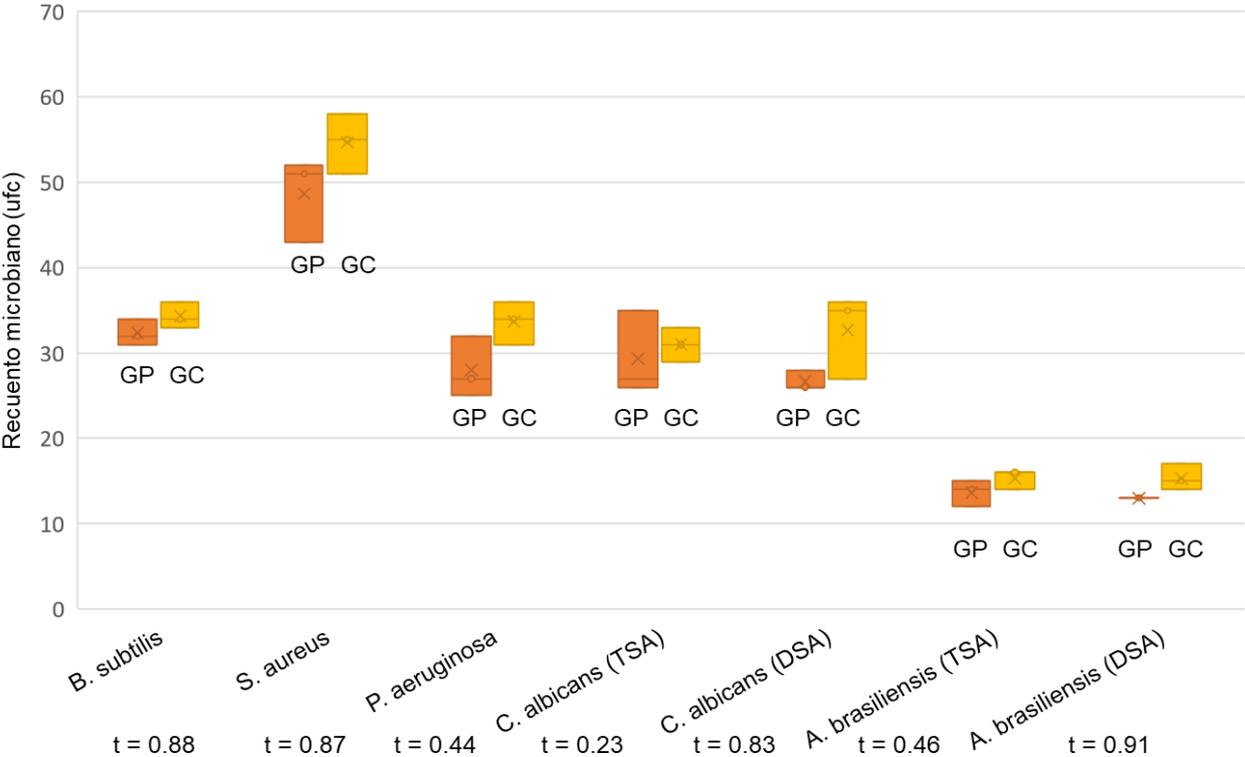


b. Robustez

Los resultados obtenidos de robustez demuestran que el crecimiento bacteriano no se ve afectado por el bicarbonato de calcio, es decir que la muestra puede ser utilizada en la fabricación de productos farmacéuticos sin necesidad de utilizar conservantes o algún otro material que mantenga la carga bacteriana baja (Ver anexo - Tabla 12.1). No obstante, se observa, al igual que en los datos de precisión, algunos valores de “t” de Student que están cerca al límite de aceptabilidad. Es probable que esto se deba al método utilizado, filtración por membrana, ya que restringe el crecimiento bacteriano y de hongos a un área más delimitada (Ver Anexo - Tabla 12.2).

Del mismo modo, los resultados de promoción de crecimiento obtenidos de los medios de cultivo utilizados en la validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de recuento microbiano de bicarbonato de sodio demuestran que, los medios de cultivo sólidos obtuvieron un porcentaje de recuperación dentro del 50 y 200%, mientras que los medios de cultivo líquidos muestran presencia de turbidez con las cepas evaluadas (Ver Anexo - Tabla 13).

GRÁFICO 5 Resultados de la precisión del crecimiento microbiano expuesto a bicarbonato de sodio



8.5 Validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de microorganismos específicos de Bicarbonato de Sodio por el método de filtración por membrana.

El bicarbonato de sodio tiene como microorganismo específico a *E. coli*, la cual ha demostrado crecimiento típico en los medios de cultivo selectivos utilizados en la

validación. Por tal motivo, se comprueba que el análisis de la muestra por el método de filtración no inhibe el crecimiento de la bacteria patógena.

a. Especificidad

Los resultados demuestran el crecimiento típico del microorganismo *E. coli* ATCC 8739, durante los periodos de 24 h, 48 h y 72 h de incubación. Por ello, a diferencia de la muestra de sulfadiazina de plata, se puede concluir que el bicarbonato de sodio no necesita de un periodo de incubación mayor al estipulado por el método normalizado (Ver Anexo - Tabla 14).

b. Robustez

Se puede deducir, de la información anterior, que el microorganismo no pierde sus propiedades bioquímicas ni se presenta inhibición en su crecimiento durante 72 h de incubación. Es decir, la muestra no genera un cambio significativo en la estructura bioquímica del microorganismo.

Además, los resultados de la promoción de crecimiento de los medios de cultivo selectivos utilizados en la validación del examen microbiológico de productos no estériles – prueba de microorganismos específicos del bicarbonato de sodio, demuestran que la cepa *E. coli* presenta un crecimiento típico en los medios de cultivo evaluados, mientras que la cepa *S. aureus* presenta inhibición en su crecimiento debido a las propiedades bioquímicas de los medios de cultivo (Ver Anexo - Tabla 15).

IX. DISCUSIÓN

La validación de ensayos microbiológicos tiene su fundamento en asegurar que la calidad de los productos farmacéuticos está siendo evaluada de forma adecuada permitiendo la recuperación de microorganismos que puedan contaminar el producto o estar en contacto con el mismo durante su fabricación (MHS, 2012). En este trabajo de tesis se han evaluado dos productos farmacéuticos no estériles en cuya fabricación se ven involucradas áreas y máquinas no clasificadas como estériles por lo que era imperativa la validación de los análisis microbiológicos de estos. Asimismo, de acuerdo a la normativa nacional (MINSA, 2016), las validaciones realizadas están clasificadas en Categoría I, por la prueba de recuento microbiano, por lo que se calcularon las variables de exactitud, precisión y robustez; y Categoría III por la prueba de microorganismos específicos por lo que se calcularon las variables de especificidad y robustez. Por otro lado el uso de cepas certificadas ATCC, otorga confiabilidad a los ensayos realizados debido a las características intrínsecas de las cepas, las cuales constan de bacterias patógenas y microorganismos ambientales que pueden afectar la integridad del producto, además, los resultados obtenidos demuestran que los productos evaluados son susceptibles a la contaminación de las cepas utilizadas, lo que refuerza la idea de que un ensayo de validación permite elucidar que los componentes de un producto farmacéutico pueden inhibir o favorecer el crecimiento bacteriano (Sueros, G. 2013).

La sulfadiazina de plata, está clasificada como fármaco de uso externo por lo que su especificación normal de límite microbiano es de máximo 200 ufc/g de bacterias y 20 ufc/g de hongos y levaduras, así como también la ausencia de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. typhimurium* en 1 g de muestra (USP 39, 2016). Debido a que este compuesto puede presentar actividad antimicrobiana en mínimos porcentajes, es demostrado que, en un ensayo microbiológico regular no se obtenga crecimiento de bacterias ni hongos (García, S. 2013). No obstante, en los resultados de este trabajo se puede observar una recuperación microbiana comparable entre en el grupo de prueba y el grupo control con respecto a la prueba de recuento microbiano, por lo tanto, se deduce que la muestra no inhibe el crecimiento microbiano, del mismo modo,

no causa la reducción de la población microbiana o su incremento en un mayor tiempo de incubación demostrado por los datos de robustez, esto se puede deber a que la sulfadiazina de plata, se utiliza en una concentración de 1 – 5% en los productos farmacéuticos, sin embargo, esto no significa que otras cepas diferentes de las cepas certificadas puedan inhibirse por acción de la sulfadiazina de plata, como el caso *S. aureus*, y otras bacterianas habitantes de la superficie de la piel (Alayo, G. 2013). Por otro lado, en el caso de la prueba de microorganismos específicos, se demuestra que un tiempo de incubación de 24 h, los microorganismos patógenos no son capaces de desarrollarse en el medio de cultivo de enriquecimiento, específicamente en el caso de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, es probable que este resultado se deba a si bien la muestra no inhibe el crecimiento bacteriano, puede generar un efecto bacteriostático en un corto periodo de tiempo de incubación, especialmente, si el fármaco se ha elaborado con moléculas de plata cargados positivamente, ya que se demuestra que pueden generar un efecto bactericida ante patógenos oportunistas o evitar la formación de biofilm, característica utilizada por bacterias patógenas para prolongar enfermedades (Silver, S. 2003). Por ello es recomendable mantener la fase de enriquecimiento por un mayor tiempo de incubación para asegurar la recuperación de microorganismos patógenos que posiblemente hayan contaminado una muestra de sulfadiazina de plata.

En el caso de bicarbonato de sodio, tanto la prueba de recuento microbiano como la prueba de microorganismos específicos ha resultado en la recuperación óptima de las bacterias y hongos evaluados. Estos resultados difieren en el caso de otros medicamentos orales en los que se utilizan conservantes o excipientes que prolongan la actividad biológica de los fármacos, como el caso de jarabes o cápsulas de liberación prolongada, ya que, estos compuestos pueden causar la inhibición o decrecimiento de bacterias en un medio de cultivo (Araujo de Assis, P. *et al* 2011). No obstante, al realizarse la prueba por el método de filtración es probable la mayoría de excipientes de un fármaco con bicarbonato de sodio hayan sido removidos de la solución. Por otro lado, se puede observar en el recuento microbiano que los datos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus brasiliensis* presentan valores t de Student muy cercanos al límite permitido, es decir que tienen tendencia a presentar diferencias significativas; esto se puede deber a un efecto adverso que tiene el

producto en el crecimiento de las cepas, ya que, la muestra evaluada presenta como principio activo principal al bicarbonato de sodio, y se ha demostrado, que éste en altas concentraciones puede inhibir levaduras como *Candida albicans* (Gonzales, E. 2017), otro motivo puede darse después el punto de vista macroscópico, ya que algunos que crecen en unidades requieren un espacio mayor al de la membrana de filtración utilizada en el método evaluado, como el caso de *Aspergillus brasiliensis*. Sin embargo, a pesar de estas observaciones, se puede asegurar que los métodos utilizados para la validación cumplen con los estándares nacionales (MINSA, 2013) e internacionales (OMS, 2013) para el desarrollo de técnicas analíticas que permitan elucidar que los productos evaluados son propensos a contaminarse con microorganismos patógenos y ambientales y que pueden ser evaluados mediante métodos estandarizados.

X. CONCLUSIONES

La estandarización de inóculos resultante utilizada en la validación fue de 10^{-8} en el caso de *E. coli* ($t = 0.51$), *S. aureus* ($t = 0.89$), *P. aeruginosa* ($t = 0.83$) y *S. typhimurium* (0.5); y 10^{-7} en el caso de *B. subtilis* ($t = 0.52$), *C. albicans* ($t = 0.08$), *A. brasiliensis* ($t = 0.84$). En base a estos resultados se pudo calcular el inóculo necesario para recuperar de 10 – 100 ufc de microorganismos en las muestras evaluadas.

Las promociones de crecimiento realizadas en los medios de cultivo de las validaciones ensayadas obtuvieron un porcentaje de recuperación entre el 50 – 200% en el caso de medios de cultivo sólidos (TSA, DSA, medios selectivos) con respecto al control y se obtuvo presencia de turbidez de las cepas evaluadas en los medios de cultivo líquido (CS, medios selectivos), demostrando que los medios de cultivo mantienen las características adecuadas para las funciones que se ha requerido.

El ensayo microbiológico de productos no estériles ha sido validado para la sulfadiazina de plata por el método de vertido en placa, con los microorganismos utilizados en el ensayo. La prueba de recuento microbiano puede efectuarse según el método normalizado (USP <61>), obteniendo resultados de exactitud entre 50 – 200% de recuperación microbiana, precisión con valores $t > 0.05$, demostrando ausencia de diferencias significativas en los tres lotes evaluados y robustez con crecimiento bacteriano constante; no obstante, en el caso de la prueba de microorganismos específicos (USP <62>) se debe incubar el medio de cultivo de enriquecimiento con la muestra por un periodo no menor a 48 h para asegurar la recuperación de microorganismos patógenos posiblemente presentes en la muestra.

El ensayo microbiológico de productos no estériles ha sido validado para el bicarbonato de sodio por el método de filtración por membrana. La prueba de recuento microbiano debe realizarse según método normalizado (USP <61>), y la prueba de microorganismos específicos de acuerdo al método internacional (USP <62>). Asimismo, se concluye que debido al área de crecimiento reducida que tienen los microorganismos es imperativo realizar las lecturas de resultados en los tiempos que corresponde: bacterias no más de 3 días y hongos no más de 5 días, demostrado en los resultados de robustez.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbasian, F., Ghafar-Zadeh, E., Magierowski, S, (2018). Microbiological Sensing Technologies: A review. *Bioengineering*, 5, 20, 1 – 33.
2. Aghili, S., Nejad, A., Jabbari, M., Abastabar, M. 2016. Recovery and detection of fungal contaminants in some ointments and tablets after opening of the packages in hospitals. *Iranian Journal of Health Sciences*, 4(4), 1 – 13.
3. Alayo, G, (2013). Efecto in vitro del propoleo sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* comparado con sulfadiazina de plata. Universidad Nacional de Trujillo, 1 – 68.
4. Araujo de Assis, P., Borba de Andrade, S., Carvalho de Oliveira, C., Menezes de Araujo, P., Junior, S., Vieira, S, (2011). Development and validation of a microbial counting method for mebendazole oral suspension. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 3, 1 – 10.
5. ATCC, (2003). References strains: How many passages are too many?. *ATCC Connection*, 23, 2, 1 – 4.
6. ATCC, (2014). Microbiological quality control of pharmaceuticals products. 1 – 2.
7. ATCC, (2017). Pharmaceutical microbiology. 1 – 16.
7. Atiyeh, B., Costagliola, M., Hayek, S., Dibo, S, (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*, 33, 139 – 148.
8. Badi, B., Maurice, N., Sadikot, R. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Bio films. *JSM Microbiology*, 5(2), 1 – 11.
9. Borris, R., Danchin, A., Harwood, C., Médigue, C., Rocha, E., Sekowska, A., Vallenet, D. 2018. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement. *Microbial Biotechnology*, 11(3), 3 – 17.
10. Cedillo, E., Hernández, A., Villafuerte, L, (2007). Efecto del bicarbonato de sodio sobre la flotación y la liberación controlada del metronidazol desde matrices de Methocel K4M y Carbopol 971PNF. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(2), 33 – 41.

11. Dadar, M., Tiwari, R., Kathik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., Dhama, K. 2018. *Candida albicans* – Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128 – 138.
12. Dara, F. 2012. Research topic on *Pseudomonas aeruginosa*, biology, genetics, and host-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 3(20), 1 – 2.
13. FDA, (2015). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry. CFR 312.23, 7, 1 – 15.
14. Gad, D., Ibrahim, R., El-din, M. 2011. Microbial evaluation of some non-sterile pharmaceutical preparations commonly used in the Egyptian market. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), 437 – 445.
15. García, S, (2013). Análisis Microbiológico de Productos No Estériles y Dietéticos elaborados por la Industria Farmacéutica Nacional. Universidad Nacional de Trujillo, 1 – 62. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38, 2, 33 – 41.
16. Goyal, R., Sami, H., Mishra, V., Bareja, R., Behara, R. 2016. Non-Albicans Candiduria: an emerging threat. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(3), 48 – 50.
17. El-Adhami, W., Stewart, P. 1997. Genome organization of *Staphylococcus aureus* isolates from different populations. *Journal of Medicine and Microbiology*, 46, 297 – 306.
18. El peruano, (2009). Normas Legales: Ley N° 29459 “Ley de los productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios”. 1 – 12.
19. El peruano, (2011). Normas Legales: D.S. N°016-2011-S.A. “Reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios. 1 – 140.
20. Garai, P., Gnanadhas, D., Chakravorty, D. 2012. *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms. *Landes Biosciences*, 3(4), 1 – 11.
21. González, E. (2017). Efecto del borosán y del bicarbonato de sodio en la *Candida albicans*: estudio in vitro. Universidad de Las Américas, 1 – 79.

22. Hufnagel, D., DePas, W., Chapman, M. (2015). The Biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbial Spectr*, 3(3), 1 – 24.
23. Instituto Nacional de Salud, (2012). Resolución Jefatural N°277-2012-J-OPE/INS: Reglamento de la red de laboratorios de control de calidad de medicamentos y afines del sector salud. 1 – 20.
24. International Consensus, (2012). Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus. London, Wound International, 1 – 24.
25. Jatto, E., Okhamafe, A, (2002). An Overview of Pharmaceutical Validation and Process Controls in Drugs Development. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 1(2), 115 – 122.
26. Keseler, I., Collado, J., Santos, A., Peralta, M., Gama, S., Muñoz, L., Bonavides, C., Paley, S., Krummenacker, M., Altman, T., Kaipa, P., Spaulding, A., Pacheco, J., Latendresse, M., Fulcher, C., Sarker, M., Shearer, A., Mackie, A., Paulsen, I., Gunsalus, R., Karp, P. 2011. EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acid Research*, 39, 1 – 9.
27. Krull, R., Cordes, C., Horn, H., Kampen, I., Kwade, A., Neu, T., Nörtemann, B. 2010. Morphology of filamentous fungi: Linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.*, 121, 1 – 21.
28. Management Science for Health (MHS), (2012). Quality assurance for pharmaceuticals, Chapter 19, 1 – 23.
29. Manasa, D. 2016. Pathology, Ecology and Infection of *E. coli*. *Research and Reviews Journal of Medical and Health Sciences*, 5(3), 1 – 7.
30. Ministerio de Salud, (2013). Nota informativa N° 016-2013-DG-DIGEMIN/MINSA: Documento Técnico: Manual de buenas practicas de laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos. 1 – 51.
31. Ministerio de Salud, (2016). Reglamento que regula la información mínima del documento que debe contener la validación de técnicas analíticas propias. 1 – 9.
32. Okunlola, A., Adewoyin, B., Odeku, O. 2007. Evaluation of Pharmaceutical and Microbial Qualities of Some Herbal Medicinal Products in South Western Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(1), 661 – 670.

- 33.OMS, (2006). Quality assurance of pharmaceuticals: A compendium of guidelines and related materials, 2, Ed. 2, 1 – 409.
- 34.OMS, (2013). Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica, Documento Técnico N° 11, 1 – 38.
- 35.Perilla, L, (2013). Verificación de la aptitud de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos para productos terminados elaborados por Anglopharma S.A. Pontificia Universidad Javeriana. 1 – 56.
- 36.Polka, J., Silver, P. 2014. Induced sensitivity of *Bacillus subtilis* colony morphology to mechanical media compression. Peer J, 1 – 12.
- 37.Quintana, S., Días, P., Mazón, G., Arias, D., Calderón, M., Herrera, A. 2017. Genoma de *Candida albicans* y resistencia a drogas. Salud Uninorte, Barranquilla, 33(3), 438 – 450.
- 38.Rao, V., Reddy, H., Subba, B., Chandra, J., Kavikishore, P., Vijaralakshmi, M. 2008. Detection of indicator pathogens from pharmaceutical finished products and raw materiales using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35, 1007 – 1018.
- 39.Romero, X, (2002). Elaboración de un manual de métodos alternos para la preparación de soluciones parenterales de gran volumen de uso hospitalario. Universidad de El Salvador, 1 – 107.
- 40.Sakhno, N., Gunar, O, (2016). Microbial identification methods in pharmaceutical analysis: Comparison and Evaluation. Mathews Journal of Pharmaceutical Sciencies, 1, 1 – 8.
- 41.Salvatierra, G., Rímac, R., Chero, A., Reyna, I., Rosadio, R., Maturrano, L. 2018. Resistencia antimicrobiana y genotipificación de cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cuyes (*Cavia porcellus*) provenientes de granjar de producción intensiva de la ciudad de Lima, Perú. Rev. Inv. Vet. Perú, 29(1), 319 – 327.
- 42.Silver, S, (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbiology Reviews, 27, 341 – 353.
- 43.Solis, F., Cortés, L., Saavedra, R., Ramírez, C, (2007). Efectividad de la sulfadiazina de plata en reepitelización de heridas por quemaduras con líquidos

- calientes en zonas neutras en niños. *Revista Chilena de Pedtría*, 78(6), 607 – 614.
44. Sueros, G, (2013). Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1 – 80.
45. Sutton, S, (2015). Validation of Alternative Microbiology Methods for Product Testing: Quantitative and Qualitative Assays. *Pharmaceutical Technology*, 1 – 3.
46. Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T., Fowler, V. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiological Review*, 28 (3), 1 – 59.
47. USP 39, (2016). Chapter <61>: Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial enumeration tests, Ed. 39, 1 – 5.
48. USP 39, (2016). Chapter <62>: Microbiological Examination of Nonsterile Products: Test of Specified Microorganism, Ed. 39, 1 – 5.
49. USP 39, (2016). Chapter <1225>: Validation of Compendial Procedures: Analytical Performance Characteristics, Ed. 39, 1 – 6.
50. Vesth, T., Nybo, K., Theobald, S., Frisvad, J., Larsen, T., Nielsen, K., Hoof, J., Brandl, J., Salamov, A., Riley, R., Gladden, J., Phatale, P., Nielsen, M., Lyhne, E., Kogle, M., Strasser, K., McDonell, E., Barry, K., Clum, A., Chen, C., LaButti, K., Haridas, S., Nolan, M., Sandor, L., Kuo, A., Lipzen, A., Hainaut, M., Drula, E., Tsang, A., Magnuson, J., Henrissat, B., Wiebenga, A., Simmons, B., Mäkelä, M., de Vries, R., Grigoriev, I., Mortensen, U., Baker, S., Andersen, M. 2018. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section *Nigri*. *Nature Genetics*, 1 – 13.
51. Vijayakumar, R., Venkatesa, V., Manoharan, C. 2011. Molecular diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in ophtalmic viscosurgical devices. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 579 – 584.
52. Vu, N., Lou, J., Kupiec, T, (2014). Microbial limit test for nonsterile pharmaceuticals, part 1. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 18, 3, 1 – 9.

XII. ANEXOS

TABLA 1 Resultados de la estandarización de cepas en las diluciones 10^{-7} a 10^{-9}

CEPA	Dilución	1° Repetición			2° Repetición			3° Repetición			Prom.
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
<i>B. subtilis</i>	10^{-6}	426	413	433	427	416	432	418	423	429	424
	10^{-7}	42	44	46	41	46	42	46	45	45	44
	10^{-8}	4	3	4	4	4	6	3	3	5	4
<i>S. aureus</i>	10^{-7}	564	567	587	544	576	533	554	552	543	559
	10^{-8}	56	53	57	56	59	52	61	56	52	56
	10^{-9}	7	5	4	3	6	5	5	7	8	5
<i>P. aeruginosa</i>	10^{-7}	267	278	264	287	298	278	254	235	243	269
	10^{-8}	26	28	31	25	28	34	26	28	31	29
	10^{-9}	2	2	3	3	5	2	2	6	4	3
<i>E. coli</i>	10^{-7}	336	345	339	376	366	365	347	352	346	353
	10^{-8}	35	37	31	32	38	39	34	37	31	35
	10^{-9}	3	5	2	4	6	5	3	6	2	4
<i>S. typhimurium</i>	10^{-7}	416	426	431	453	433	443	414	419	426	430
	10^{-8}	45	46	41	41	48	43	42	40	46	44
	10^{-9}	4	4	5	4	5	6	4	8	6	5
<i>C. albicans</i>	10^{-6}	267	243	255	229	236	235	254	245	236	244

P1, P2, P3: Placa 1, 2, y 3

Prom.: Promedio aritmético

TABLA 2 Suspensiones microbianas entre 10 – 100 UFC

CEPA	Dilución	1° Repetición			2° Repetición			3° Repetición			Prom.	σ	Valor t
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3			
<i>B. subtilis</i>	10^{-7}	42	44	46	41	46	42	46	45	45	44	1.789	0.52
<i>S. aureus</i>	10^{-8}	56	53	57	56	59	52	61	56	52	56	2.752	0.89
<i>P. aeruginosa</i>	10^{-8}	26	28	31	25	28	34	26	28	31	29	2.617	0.83
<i>E. coli</i>	10^{-8}	35	37	31	32	38	39	34	37	31	35	2.779	0.51
<i>S. typhimurium</i>	10^{-8}	45	46	41	41	48	43	42	40	46	44	2.501	0.5
<i>C. albicans</i>	10^{-7}	26	29	32	24	26	21	29	27	28	27	3.092	0.08
<i>A. brasiliensis</i>	10^{-7}	17	12	15	16	15	14	14	14	16	15	1.327	0.84

P1, P2, P3: Placas 1, 2 y 3

Prom.: Promedio aritmético

TABLA 3 Promoción de crecimiento de los medios de cultivo utilizados en la estandarización de cepas

Medio de Cultivo	Lote	Grupo	Cepas					Control Negativo
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
TSA	ECP-TSA-01	GP	43	51	24	NA	NA	-
		GC	42	56	27	NA	NA	
		%Rec.	102%	91%	89%	NA	NA	
	ECP-TSA-02	GP	40	55	26	NA	NA	-
		GC	45	56	29	NA	NA	
		%Rec.	89%	98%	90%	NA	NA	
	ECP-TSA-03	GP	43	52	29	NA	NA	-
		GC	47	55	34	NA	NA	
		%Rec.	91%	95%	85%	NA	NA	
DSA	ECP-DSA-01	GP	NA	NA	NA	33	15	-
		GC	NA	NA	NA	36	17	
		%Rec.	NA	NA	NA	92%	88%	
	ECP-DSA-02	GP	NA	NA	NA	26	14	-
		GC	NA	NA	NA	32	16	
		%Rec.	NA	NA	NA	81%	88%	
	ECP-DSA-03	GP	NA	NA	NA	27	16	-
		GC	NA	NA	NA	31	16	
		%Rec.	NA	NA	NA	87%	100%	

%Rec.: Porcentaje de Recuperación NA: No aplica

TABLA 4 Porcentajes de recuperación obtenidos entre los grupos de prueba (GP) y grupos control (GC) de los tres lotes de sulfadiazina de plata

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote				2° Lote				3° Lote			
			P1	P2	Prom.	%Rec.	P1	P2	Prom.	%Rec.	P1	P2	Prom.	%Rec.
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	46	44	45	99%	39	44	42	100%	46	41	44	94%
		GC	42	49	46		43	40	42		44	49	47	
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	58	51	55	91%	54	49	52	87%	51	58	55	90%
		GC	66	54	60		61	57	59		63	58	61	
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	29	26	28	92%	28	31	30	100%	26	29	28	87%
		GC	33	27	30		33	26	30		33	30	32	
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	34	31	33	98%	25	27	26	81%	31	26	29	81%
		GC	29	37	33		34	30	32		36	34	35	
	DSA	GP	33	32	33	108%	31	27	29	85%	29	31	30	86%
		GC	25	35	30		36	32	34		33	37	35	
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	17	13	15	88%	14	17	16	84%	12	15	14	87%
		GC	16	18	17		18	19	19		14	17	16	
	DSA	GP	19	14	17	80%	16	13	15	91%	13	16	15	94%
		GC	21	20	21		14	18	16		13	18	16	

P1, P2: Placa 1 y 2

Prom.: Promedio

%Rec.: Porcentaje de Recuperación

TABLA 5 Valores de la prueba “t” de Student para muestras independientes de los tres lotes evaluados de sulfadiazina de plata

P1, P2: Placa 1 y 2 Prom.: Promedio aritmético

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote		2° Lote		3° Lote		Prom.	σ	Valor t
			P1	P2	P1	P2	P1	P2			
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	46	44	39	44	46	41	40	12.94	0.32
		GC	42	49	43	40	44	49	46	3.792	0.4
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	58	51	54	49	51	58	49	15.93	0.56
		GC	66	54	61	57	63	58	61	3.92	0.89
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	29	26	28	31	26	29	27	8.718	0.45
		GC	33	27	33	26	33	30	31	2.562	0.92
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	34	31	25	27	31	26	27	9.034	0.07
		GC	29	37	34	30	36	34	33	2.578	0.84
	DSA	GP	33	32	31	27	29	31	28	9.089	0.23
		GC	25	35	36	32	33	37	33	3.381	0.54
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	17	13	14	17	12	15	14	4.472	0.86
		GC	16	18	18	19	14	17	18	1.314	0.31
	DSA	GP	19	14	16	13	13	16	14	4.808	0.56
		GC	21	20	14	18	13	18	18	2.564	0.16

TABLA 6.1 Promedio del crecimiento de microorganismos obtenido durante las 72 h, 96 h y 120 h de los tres lotes evaluados de sulfadiazina de plata

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote						2° Lote						3° Lote						Prom.
			72 h		96 h		120 h		72 h		96 h		120 h		72 h		96 h		120 h		
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	46	44	47	44	49	45	39	44	42	45	43	45	46	41	46	42	48	44	41
		GC	42	49	44	51	46	55	43	40	47	42	49	43	44	49	46	51	48	52	47
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	58	51	58	53	59	55	54	49	55	51	56	51	51	58	53	59	54	59	51
		GC	66	54	66	55	69	57	61	57	64	58	65	59	63	58	64	59	64	62	61
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	29	26	32	28	33	29	28	31	29	32	32	32	26	29	27	31	29	33	28
		GC	33	27	33	28	33	28	33	26	35	29	35	31	33	30	34	31	35	31	31
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	34	31	35	31	35	31	25	27	26	27	26	27	31	26	31	27	31	27	27
		GC	29	37	29	37	30	37	34	30	34	30	34	31	36	34	36	35	36	35	33
	DSA	GP	33	32	34	32	34	32	31	27	32	27	32	27	29	31	30	31	31	31	29
		GC	25	35	27	35	27	36	36	32	36	33	36	33	33	37	33	38	34	38	33
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	17	13	17	13	17	14	14	17	14	17	15	17	12	15	13	15	13	15	14
		GC	16	18	16	18	16	19	18	19	18	19	18	19	14	17	15	17	16	17	17
	DSA	GP	19	14	20	14	20	14	16	13	16	14	16	15	13	16	16	17	16	17	15
		GC	21	20	21	20	21	20	14	18	15	18	15	18	13	18	14	18	15	18	18

P1, P2: Placa 1 y 2

Prom.: Promedio aritmético

TABLA 6.2 Porcentaje de recuperación, desviación estándar y valor “t” obtenido de los tres lotes evaluados

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	%Rec.	σ	Valor t
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	89%	11.58	0.82
		GC		3.663	0.31
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	83%	14.35	0.95
		GC		3.553	0.52
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	88%	7.804	0.91
		GC		2.445	0.06
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	82%	8.05	0.42
		GC		2.504	0.08
	DSA	GP	86%	8.078	0.59
		GC		3.307	0.07
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	81%	3.963	0.51
		GC		1.366	0.07
	DSA	GP	84%	4.321	0.73
		GC		2.509	0.06

%Rec: Porcentaje de recuperaci

TABLA 7 Resultados de la promoción de crecimiento de los medios de cultivo utilizados en la validación del recuento microbiano de sulfadiazina de plata

Medio de Cultivo	Lote	Grupo	Cepas					Control Negativo
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
TSA	SFA-TSA-01	GP	39	47	26	NA	NA	-
		GC	41	53	32	NA	NA	
		%Rec.	95%	89%	81%	NA	NA	
	SFA-TSA-02	GP	43	54	27	NA	NA	-
		GC	47	52	25	NA	NA	
		%Rec.	91%	104%	108%	NA	NA	
	SFA-TSA-03	GP	41	51	26	NA	NA	-
		GC	46	55	29	NA	NA	
		%Rec.	89%	93%	90%	NA	NA	
DSA	SFA-DSA-01	GP	NA	NA	NA	32	16	-
		GC	NA	NA	NA	31	13	
		%Rec.	NA	NA	NA	103%	123%	
	SFA-DSA-02	GP	NA	NA	NA	23	15	-
		GC	NA	NA	NA	28	19	
		%Rec.	NA	NA	NA	82%	79%	
	SFA-DSA-03	GP	NA	NA	NA	25	14	-
		GC	NA	NA	NA	33	16	
		%Rec.	NA	NA	NA	76%	88%	
CS	SFA-CS-01	GP	+	+	+	+	+	-
		GC	+	+	+	+	+	
	SFA-CS-02	GP	+	+	+	+	+	-
		GC	+	+	+	+	+	
	SFA-CS-03	GP	+	+	+	+	+	-
		GC	+	+	+	+	+	

+: Crecimiento visible

-: No crecimiento

NA: No aplica

TABLA 8 Resultados observados en la recuperación de microorganismos patógenos en medios de cultivo selectivos durante 24 h, 48 h y 72 h de incubación

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote			2° Lote			3° Lote		
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>E. coli</i>	CMC	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	MC	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	EMB	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
<i>S. aureus</i>	MS	GP	-	T	T	-	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	VJ	GP	-	T	T	-	T	T	-	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	Coag.	GP	NA	+	+	NA	+	+	+	+	+
		GC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	CT	GP	T	T	T	T	T	T	-	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	PSP	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	PSF	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Oxid.	GP	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+
	GC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	CRV	GP	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		GC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	XLD	GP	-	T	T	-	T	T	-	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T

T: Crecimiento típico

+: Resultado positivo

-: Ausencia de crecimiento

TABLA 9.1 Resultados de la promoción de crecimiento de los medios de cultivo selectivos utilizados en la validación de la prueba de microorganismos específicos de sulfadiazina de plata

Medio de Cultivo (Selectivos)	Lote	Grupo	Cepas				Control Negativo
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	
CMC	SFA-CMC-01	GP	T	-	NA	NA	-
		GC	T	-	NA	NA	
	SFA-CMC-02	GP	T	-	NA	NA	-
		GC	T	-	NA	NA	
	SFA-CMC-03	GP	T	-	NA	NA	-
		GC	T	-	NA	NA	
MC	SFA-MC-01	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	SFA-MC-02	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	SFA-MC-03	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
EMB	SFA-EMB-01	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	SFA-EMB-02	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	SFA-EMB-03	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
MS	SFA-MS-01	GP	-	T	NA	NA	-
		GC	-	T	NA	NA	
	SFA-MS-02	GP	-	T	NA	NA	-
		GC	-	T	NA	NA	
	SFA-MS-03	GP	-	T	NA	NA	-
		GC	-	T	NA	NA	

T: Crecimiento típico

-: Ausencia de crecimiento

NA: No aplica

TABLA 9.2 Resultados de la promoción de crecimiento de los medios de cultivo selectivos utilizados en la validación de la prueba de microorganismos específicos de sulfadiazina de plata

Medio de Cultivo (Selectivos)	Lote	Grupo	Cepas				Control Negativo
			<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	
VJ	SFA-VJ-01	GP	-	T	NA	NA	-
		GC	-	T	NA	NA	
	SFA-VJ-02	GP	-	T	NA	NA	-
		GC	-	T	NA	NA	
	SFA-VJ-03	GP	-	T	NA	NA	-
		GC	-	T	NA	NA	
CT	SFA-CT-01	GP	-	NA	T	NA	-
		GC	-	NA	T	NA	
	SFA-CT-02	GP	-	NA	T	NA	-
		GC	-	NA	T	NA	
	SFA-CT-03	GP	-	NA	T	NA	-
		GC	-	NA	T	NA	
PSP	SFA-PSP-01	GP	NA	NA	T	NA	-
		GC	NA	NA	T	NA	
	SFA-PSP-02	GP	NA	NA	T	NA	-
		GC	NA	NA	T	NA	
	SFA-PSP-03	GP	NA	NA	T	NA	-
		GC	NA	NA	T	NA	
PSF	SFA-PSF-01	GP	NA	NA	T	NA	-
		GC	NA	NA	T	NA	
	SFA-PSF-02	GP	NA	NA	T	NA	-
		GC	NA	NA	T	NA	
	SFA-PSF-03	GP	NA	NA	T	NA	-
		GC	NA	NA	T	NA	

T: Crecimiento típico

-: Ausencia de crecimiento

NA: No aplica

TABLA 10 Porcentajes de recuperación obtenidos entre los grupos de prueba (GP) y grupos control (GC) de los tres lotes de bicarbonato de sodio

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote		% Rec	2° Lote		% Rec	3° Lote		% Rec
			P1	Prom.		P1	Prom.		P1	Prom.	
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	32	32	89%	31	31	91%	34	34	94%
		GC	36	36		34	34		36	36	
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	52	52	90%	51	51	93%	43	43	84%
		GC	58	58		55	55		51	51	
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	32	32	89%	27	27	79%	25	25	81%
		GC	36	36		34	34		31	31	
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	35	35	106%	26	26	84%	27	27	93%
		GC	33	33		31	31		29	29	
	DSA	GP	26	26	72%	28	28	80%	26	26	96%
		GC	36	36		35	35		27	27	
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	15	15	94%	12	12	86%	14	14	88%
		GC	16	16		14	14		16	16	
	DSA	GP	13	13	87%	13	13	76%	13	13	93%
		GC	15	15		17	17		14	14	

P1: Placa 1

Prom.: Promedio aritmético

TABLA 11 Valores de la prueba “t” de Student para muestras independientes de los tres lotes evaluados de bicarbonato de sodio

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote	2° Lote	3° Lote	Prom.	σ	Valor "t"
			P1	P1	P1			
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	32	31	34	33	10.9885	0.88
		GC	36	34	36	36	0.96742	0.08
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	52	51	43	44	17.7696	0.87
		GC	58	55	51	57	2.32324	0.07
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	32	27	25	25	10.2926	0.44
		GC	36	34	31	32	3.85473	0.10
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	35	26	27	27	11.2656	0.23
		GC	33	31	29	32	1.36344	0.10
	DSA	GP	26	28	26	24	9.41763	0.83
		GC	36	35	27	35	2.44949	0.18
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	15	12	14	12	4.67928	0.46
		GC	16	14	16	15	1.03775	0.09
	DSA	GP	13	13	13	12	4.47554	0.91
		GC	15	17	14	16	0.9871	0.18

P1: Placa 1

Prom.: Promedio aritmético

TABLA 12.1 Promedio del crecimiento de microorganismos obtenido durante las 72 h, 96 h y 120 h de los tres lotes evaluados de bicarbonato de sodio

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote			2° Lote			3° Lote			Prom.
			72 h	96 h	120 h	72 h	96 h	120 h	72 h	96 h	120 h	
			P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	32	33	33	31	31	31	34	34	35	34
		GC	36	36	37	34	35	35	36	37	37	36
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	52	52	52	51	51	52	43	45	46	44
		GC	58	59	59	55	56	56	51	52	52	56
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	32	32	32	27	27	27	25	28	28	26
		GC	36	27	26	34	34	34	31	32	32	32
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	35	35	36	26	26	27	27	28	28	27
		GC	33	33	34	31	32	32	29	30	30	32
	DSA	GP	26	27	27	28	28	29	26	27	28	25
		GC	36	36	36	35	35	36	27	27	27	33
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	15	15	15	12	12	13	14	15	15	13
		GC	16	16	16	14	14	14	16	16	16	15
	DSA	GP	13	14	14	13	13	14	13	14	14	12
		GC	15	16	16	17	17	17	14	14	14	16

P1: Placa 1

Prom.: Promedio aritmético

TABLA 12.2 Porcentaje de recuperación, desviación estándar y valor “t” obtenido de los tres lotes evaluados

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	%Rec.	σ	Valor "t"
<i>B. subtilis</i>	TSA	GP	94%	10.0566	0.96
		GC		1.0146	0.37
<i>S. aureus</i>	TSA	GP	80%	15.6807	0.47
		GC		2.96052	0.09
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	GP	81%	9.13152	0.41
		GC		3.34532	0.51
<i>C. albicans</i>	TSA	GP	85%	9.9492	0.32
		GC		1.61791	0.19
	DSA	GP	74%	8.41732	0.93
		GC		4.09088	0.08
<i>A. brasiliensis</i>	TSA	GP	82%	4.29088	0.92
		GC		0.98518	0.85
	DSA	GP	78%	4.03794	0.96
		GC		1.27187	0.07

TABLA 13 Resultados de la promoción de crecimiento de los medios de cultivo utilizados en la validación del recuento microbiano de bicarbonato de sodio

Medio de Cultivo	Lote	Grupo	Cepas					Control Negativo
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	
TSA	BSO-TSA-01	GP	45	56	28	NA	NA	-
		GC	42	62	34	NA	NA	
		%Rec.	107%	90%	82%	NA	NA	
	BSO-TSA-02	GP	42	53	24	NA	NA	-
		GC	47	61	28	NA	NA	
		%Rec.	89%	87%	86%	NA	NA	
	BSO-TSA-03	GP	41	56	26	NA	NA	-
		GC	45	59	24	NA	NA	
		%Rec.	91%	95%	108%	NA	NA	
DSA	BSO-DSA-01	GP	NA	NA	NA	26	15	-
		GC	NA	NA	NA	36	18	
		%Rec.	NA	NA	NA	72%	83%	
	BSO-DSA-02	GP	NA	NA	NA	24	16	-
		GC	NA	NA	NA	31	17	
		%Rec.	NA	NA	NA	77%	94%	
	BSO-DSA-03	GP	NA	NA	NA	26	15	-
		GC	NA	NA	NA	34	18	
		%Rec.	NA	NA	NA	76%	83%	
CS	SFA-CS-01	GP	+	+	+	+	+	-
		GC	+	+	+	+	+	
	SFA-CS-02	GP	+	+	+	+	+	-
		GC	+	+	+	+	+	
	SFA-CS-03	GP	+	+	+	+	+	-
		GC	+	+	+	+	+	

%Rec.: Porcentaje de recuperación

NA: No aplica

+: Crecimiento

TABLA 14 Resultados observados en la recuperación del microorganismo patógeno en medios de cultivo selectivos durante 24 h, 48 h y 72 h de incubación

CEPA	Medio de Cultivo	Grupo	1° Lote			2° Lote			3° Lote		
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>E. coli</i>	CMC	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	MC	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	EMB	GP	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T

T: Crecimiento típico

TABLA 15 Resultados de la promoción de crecimiento de los medios de cultivo selectivos utilizados en la validación de la prueba de microorganismos específicos de bicarbonato de sodio

Medio de Cultivo (Selectivos)	Lote	Grupo	Cepas				Control Negativo
			<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	
CMC	BSO-CMC-01	GP	T	-	NA	NA	-
		GC	T	-	NA	NA	
	BSO-CMC-02	GP	T	-	NA	NA	-
		GC	T	-	NA	NA	
	BSO-CMC-03	GP	T	-	NA	NA	-
		GC	T	-	NA	NA	
MC	BSO-MC-01	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	BSO-MC-02	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	BSO-MC-03	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
EMB	BSO-EMB-01	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	BSO-EMB-02	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	
	BSO-EMB-03	GP	T	NA	NA	NA	-
		GC	T	NA	NA	NA	

T: Crecimiento típico

-: Ausencia de crecimiento

NA: No aplica