



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Validación de la metodología para la
determinación de Bioburden en
soluciones oftálmicas a granel”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGICA**

PRESENTA

FRYDA ELIZABETH DÍAZ GANDARA



MÉXICO, D.F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: María Guadalupe Tsuzuki Reyes

VOCAL: María del Socorro Alpizar Ramos

SECRETARIO: Daniel García Escandón

1er. SUPLENTE: Luciano Hernández Gómez

2° SUPLENTE: Juan Manuel Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Alcon Laboratorios S.A. de C.V. Departamento de Control Microbiológico

ASESOR DEL TEMA:

Q.B.P. Daniel García Escandón

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.B.P. Carlos Humberto Brito Gómez

SUSTENTANTE:

Fryda Elizabeth Díaz Gandara

AGRADECIMIENTOS

Es cierto que en la vida hay ciclos que deben concluir y esta etapa no es la excepción, sin embargo, tengo presente que sin el apoyo, amor, comprensión, consejos y motivación de personas tan increíbles que acompañaron mi camino, tal vez hubiese sido un poco más difícil mi andar.

Gran parte de mis logros se los debo a mis maravillosos padres: ROSITA y FER que siempre e incondicionalmente me apoyan y que con sus lindas palabras de amor, consejos y dedicación han forjado en mi una gran lección de vida a lo largo de todo este tiempo..."no es difícil alcanzar tus sueños... siempre y cuando seas constante y perseverante"... Ustedes que me dieron la vida, que han caminado a mi lado en todo momento, que me brindaron una infancia llena de alegría, abrazos y felicidad que hoy se ve reflejada en mí, pero sobretodo GRACIAS A USTEDES porque hoy concluimos con ÉXITO un gran sueño que poco a poco se tornó REALIDAD...

Mi complemento... mis hermanos: VIOLE y FER, saben que los adoro, ser la hermana menor me enseñó a verlos como mi ejemplo, son muy buenos hermanos y también ustedes me han apoyado mucho, la prueba está en que ahora los tres ya somos profesionistas y sé como luchamos para lograrlo por eso estoy muy orgullosa de ustedes y super feliz de ahora poder compartir tanto sus éxitos como los míos... ¡LOS QUIERO MUCHO!.

Mi familia es grande pero NUNCA comparado con el corazón de mis ¡ABUELITOS y ABUELITAS!... realmente me hubiera encantado que mis hermosos 4 angelitos estuvieran conmigo físicamente, pero sé que están conmigo SIEMPRE en mi corazón y pensamiento a ustedes también les dedico esto porque gracias a sus magníficos y sabios consejos hicieron que creciera llena de amor y ternura, CRUZ como agradecerte cuanto tiempo nos dedicabas de niños esas navidades eran fantásticas, gracias por tantos abrazos, LUCHITA supongo que aún continuas de traviesa jaja, gracias por enseñarme que la vida la tenemos que vivir felices siempre y no detenernos por nada, PANCHITO realmente nunca te conocí pero mi mami nos platicaba de ti, y PEPITO abuelito... es muy difícil y doloroso para mi recordar todo lo que vivimos.... TU ESTUVISTE AL INICIO DE ESTE TRABAJO y recuerdo muy bien que lo primero que hice fue leerte mis agradecimientos, aún recuerdo aquella tarde y tu sonrisa cuando te

mencioné y así te quiero recordar por toda mi vida, por ello decidí dejar aquello que ese día puso esa linda sonrisa en tu rostro, esto es para ti...

“abuelito...de ti que no he aprendido y todo lo que falta por aprender a tu lado, tu eres mi abuelito consentido jeje no por nada cumplimos años el mismo día!, Te QUIERO MUCHO gracias por hacerme tener una infancia muy feliz con esas tardes en que llegabas con el pan jiji, increíbles tardes que nunca olvidaré... ahora nos toca seguir disfrutando de tu compañía y tu amor, este logro también es tuyo gracias por enseñarme a ver la belleza de las cosas”.

TU más que nadie estuvo en la transición de este escrito, GRACIAS POR MOTIVARME y por permitirme estar contigo hasta el final. TE AMO MI HERMOSO... SIEMPRE VIVIRÁS EN MI CORAZÓN...

A mis amigos tanto de toda mi vida como de la carrera que siempre e incondicionalmente están conmigo, gracias por brindarme su grandiosa amistad, apoyo y grandes consejos para continuar y lograr mis metas.

Como no agradecer a **TODOS MIS PROFESORES**, que gracias a su conocimiento pude aprender, gracias por los regaños y consejos que sirvieron para que sea una excelente profesionista, gracias por su dedicación y paciencia, gracias a algunos por ser más que mis profesores amigos y pronto colegas, me llevo de cada uno la mejor arma en la vida: **EL CONOCIMIENTO**.

Alcon, excelentes productos, pero lo mejor de ahí son las personas, gracias a cada uno de ustedes por abrirme las puertas, orientarme y transmitirme sus conocimientos; en especial a Carlos Brito y mi buen Julio Manriquez muchas gracias por tu paciencia y tus consejos.

Pero más que una excelente experiencia, mi estancia en **ALCON**, me llevo grandes amistades... **DANIEL GARCÍA**, no pude tener mejor asesor que **TU!**, eres una increíble persona, ahora entiendo porque nunca te dejan solo en tu oficina jaja, gracias por todos los consejos y por dedicarme tanto tiempo y brindarme tu maravillosa amistad... **CARLOS JASSO**, aunque no trabaje directamente con usted siempre estuvo en la mejor disposición de escucharme y regalarme una gran sonrisa, gracias por su alegría y amistad, **SOCORRO BERZUNZA**, muchas gracias por esas pequeñas pláticas y por siempre brindarme una linda sonrisa, **NOÉ RICO** eres un gran consejero y más cuando se trata de cosas tecnológicas jiji, gracias por tu amistad y consejos, **JOSÉ LUIS CORONA** es una persona muy agradable y gran compañero y de nuevo **CARLOS BRITO** aprendí mucho de usted, gracias por enseñarme sus técnicas y su conocimiento, en general, gracias por hacer mi estancia más agradable y permitir

compartir algunas anécdotas con ustedes y que ustedes compartieran algunas experiencias conmigo fue realmente muy enriquecedor para mí. ¡LOS EXTRAÑARE!

Y por último y no por eso menos importante, quiero agradecer a una EXCELENTE INSTITUCIÓN que es la UNAM, y en especial a la FACULTAD DE QUÍMICA que fue mi segunda casa y donde adquirí nuevos conocimientos pero sobre todo crecí y pase momentos inolvidables...

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU”

RESUMEN

En Alcon Laboratorios el proceso de fabricación de los productos oftálmicos involucra la esterilización por filtración y llenado aséptico con el fin de garantizar su esterilidad, es por ello, que los controles microbiológicos durante el proceso de fabricación son de gran importancia, uno de estos controles es la determinación de la carga microbiana antes de que el producto granel sea esterilizado por filtración, la metodología empleada para esta determinación se lleva a cabo mediante filtración en membrana y debido a que se trata de un método analítico, se encuentra sujeto a validación de acuerdo a los lineamientos descritos en la Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059).

ABSTRACT

Alcon Laboratories in the process of manufacturing ophthalmic products involves sterilization by filtration and aseptic filling to ensure sterility, therefore, that the microbiological tests during the manufacturing process are of great importance, one of these controls is determining the microbial load before the bulk product is sterilized by filtration, the methodology used for this determination is performed by membrane filtration and because it is an analytical method, is subject to validation according to the guidelines described in the Mexican Official Norm 059 (NOM-059).

ÍNDICE GENERAL

1. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVO GENERAL	1
2.1 Objetivos particulares	1
3. HIPÓTESIS	2
4. ANTECEDENTES	2
5. GENERALIDADES	5
5.1 PRODUCTOS FARMACÉUTICOS	5
5.1.1 Preparados oftálmicos: SOLUCIONES OFTÁLMICAS	5
5.2 BIOBURDEN.....	6
5.3 PROCESO DE ESTERILIZACIÓN	6
5.3.1 Estilización por filtración	7
5.4 CONTROL MICROBIOLÓGICO POR AGENTES QUÍMICOS	10
5.4.1 Conservadores antimicrobianos	10
5.4.2 Compuestos de amonio cuaternario (CAC): Cloruro de benzalconio	11
5.4.3 Mercuriales orgánicos: Timerosal	12
5.4.4 Agentes neutralizantes	12
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
6.1 Material de laboratorio y equipo	14
6.2 Material biológico, soluciones y medios de cultivo	15
6.3 Método	17
6.3.1 Preparación de suspensiones de cada microorganismo de prueba	17
6.3.2 Verificación del inóculo	21
6.3.3 Método de prueba: Validación de Bioburden	22
6.3.3.1 Problema	23
6.3.3.2 Control de cada microorganismo de prueba.....	23
6.3.3.3 Control de la muestra.....	24
7. RESULTADOS	26
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	76

9. BIBLIOGRAFÍA	78
10. MÉTODOS DE REFERENCIA	78
11. ANEXO I. Preparación de soluciones y medios de cultivo	80
12. ANEXO II. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO ME.M04.4VALMTP.0001 “Validación de la determinación de Bioburden en materia prima soluble y solución de producto antes de esterilizarse usando el método de filtración de membrana”	83
13. ANEXO III. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO ME.M95.2MTP.02000.R03 “Bioburden en producto a granel de soluciones”	92

1. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Parte de un programa de control de calidad adecuado es el seguimiento de los recuentos de carga biológica de un producto determinado.

El seguimiento de los niveles de carga biológica puede ser utilizado para aprobar un nuevo proceso de fabricación o para validar si el método que se utiliza para la recuperación de los microorganismos presentes en la muestra es el adecuado y también se utiliza rutinariamente para controlar los niveles de carga biológica.

Hay muchas variables que conforman los procesos de fabricación y envasado de un producto determinado, las que pueden afectar la carga biológica de un producto, por ejemplo, si no se detectan a tiempo aumentos considerables en los recuentos en la carga biológica, pueden afectar negativamente la utilidad y funcionalidad del producto al usuario final.

2. OBJETIVO GENERAL

Mediante la evidencia documental sustentar que el método analítico está validado y asegurar que la metodología empleada nos permite detectar y recuperar niveles bajos de microorganismos, que pudieran estar presentes en los productos granel antes del proceso de esterilización por filtración.

2.1 Objetivos particulares

- Demostrar que el ensayo cumple con el criterio de aceptación y requerimientos señalados en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).
- Validar las pruebas de Bioburden para los productos probados en este trabajo mediante el método de filtración de membrana.

3. HIPÓTESIS

Si se demuestra experimentalmente que la metodología aplicada para la determinación de la carga microbiana en los productos granel antes de su proceso de esterilización es la adecuada, entonces nos permitirá detectar niveles bajos de microorganismos viables presentes en los productos, demostrando así que el método se encuentra validado cumpliendo con los criterios establecidos para la recuperación de microorganismos indicados en la USP (Farmacopea de los Estados Unidos).

4. ANTECEDENTES

Aunque los estudios de validación se han realizado en la industria farmacéutica desde hace mucho tiempo, existe un interés cada vez mayor, debido a que en los últimos años, la industria pone singular énfasis en la garantía de calidad y fiabilidad de los resultados para todas las aplicaciones analíticas y los procesos de fabricación de los productos farmacéuticos lo cual se ve reflejado en una mejora de la productividad, por ello, la validación es una parte necesaria de un programa de garantía de calidad y es fundamental para tener una eficiente operación de producción.

Por otra parte, si bien se sabe que el objetivo primordial dentro de la industria farmacéutica es la fabricación de productos farmacéuticos de calidad, es necesario tener presentes por lo menos tres aspectos importantes: La regulación gubernamental, garantizar la calidad del producto y la reducción de costos.

El primer aspecto a considerar es la regulación que establece el gobierno, en particular, el concepto de validación se centrará principalmente de acuerdo al marco regulatorio de los Estados Unidos de América y al de los Estados Unidos Mexicanos.

El marco regulatorio de los Estados Unidos de América está regido por la oficina de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) y en ella el término de validación se define como el acto de establecer evidencia documentada que proporciona un alto grado de seguridad de que un proceso específico, produce consistentemente un producto que cumple con las especificaciones predeterminadas y atributos de calidad (Agalloco 1999), aunque esta definición de reglamentación oficial es relativamente nueva (1987), el concepto de validación no es nuevo en la industria farmacéutica.

La validación es considerada parte esencial de las Buenas Prácticas de Manufactura (GMPs por sus siglas en inglés) y por supuesto, la implicación de la validación dentro de las GMPs, nos señala lo siguiente:

Los procedimientos de control deberán ser establecidos para vigilar y validar el desempeño de los procesos de fabricación ya que estos pueden ser responsables de causar variabilidad en las características de la materia y en el proceso del producto farmacéutico.

Con respecto al marco regulatorio en México, la Norma Oficial Mexicana 059 “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos” define la **Validación** como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas; así mismo nos indica que los métodos analíticos que no sean descritos en la farmacopea y que sean utilizados para la evaluación de fármacos y aditivos así como la evaluación de producto a granel, en proceso y terminado deben ser validados de acuerdo a un protocolo aprobado.

El segundo aspecto, la validación nos permite conocer y controlar adecuadamente el proceso permitiendo así, garantizar la calidad de los productos, debido a ello, existe una íntima relación entre la validación del proceso y las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP's) ya que son garantía

esencial de calidad, por ello al validar un proceso, frecuentemente conducirá al mejoramiento de la calidad en los productos farmacéuticos.

Y el tercer aspecto es la reducción de costos puesto que, al validar un proceso este se vuelve más eficiente lo que implica menos reprocesos, desechos, desperdicios, etc, convirtiéndose una buena práctica empresarial.

El objetivo principal de la validación de métodos analíticos es demostrar que la capacidad del método satisface los requisitos para las especificaciones analíticas deseadas por medio de estudios experimentales que se encuentren documentados, teniendo en cuenta que, la fiabilidad de los resultados de dichos análisis es fundamental para garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos.

Los métodos analíticos deben ser validados o revalidados cuando se presente alguna de las siguientes situaciones:

1. Antes de usarlo como rutina para un determinado análisis.
2. Siempre que las condiciones del método validado hayan cambiado (por ejemplo, un instrumento con características diferentes).
3. Cada vez que el método original haya cambiado y el cambio se encuentre fuera del ámbito de aplicación del método.
4. Cuando el área de control de calidad indique que un método establecido cambió.
5. Cuando se requiera demostrar la equivalencia entre dos métodos (por ejemplo, un nuevo método y una norma).

Haciendo énfasis especial en los métodos de análisis microbiológico, se exige demostrar que los métodos de prueba y las condiciones en sí no inhiben el crecimiento y la detección de microorganismos que pueden estar presentes.

5. GENERALIDADES

5.1 PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

5.1.1 Preparados oftálmicos: Soluciones oftálmicas.

Con base en la Norma Oficial Mexicana 059 “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”, se define como medicamento a toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.

En general los medicamentos presentan una forma farmacéutica, es decir la forma en que se expende el producto farmacéutico y de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) se define como forma farmacéutica a la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

En particular, las soluciones son preparados líquidos, claros y homogéneos, obtenidos por dilución del o los principios activos y aditivos en agua, y que se utilizan externa o internamente, sin embargo al referirnos a soluciones oftálmicas los estándares de calidad son más específicos y por definición son soluciones estériles, libres de partículas extrañas, elaboradas y envasadas en forma apropiada para instilarlas en los ojos (*Thompson 2006*).

Debido a lo anterior, deben considerarse varios requisitos al momento de su fabricación entre ellos esterilidad, transparencia, tonicidad, osmolaridad, viscosidad, estabilidad, tamaño de partícula, envasado y conservadores.

La esterilización representa el principal requisito de los productos oftálmicos y el método empleado depende de los componentes activos y de la resistencia del producto al calor y del envasado, tal es el caso de algunas soluciones acuosas y no acuosas que son sensibles al calor por lo que no se pueden esterilizar por este medio, sin embargo se tienen alternativas como la radiación o filtración. Con respecto a la primer opción, la solución ya envasada se puede someter a radiación pero si este método no resulta práctico, el producto a granel se puede filtrar y después proceder al llenado de sus envases, asépticamente. En ambos casos es esencial que el método seleccionado sea probado respecto a su eficacia y que además, se realicen pruebas para comprobar que sus ingredientes activos no han sido alterados por el método de esterilización aplicado.

La solución o la suspensión estéril usualmente contendrá un conservador antimicrobiano para evitar la contaminación durante su empleo.

5.2 BIOBURDEN

El bioburden o carga microbiana se define como la estimación del número de microorganismos viables presentes en una materia prima, un producto o en dispositivos médicos antes del proceso de esterilización, esta prueba es utilizada de manera rutinaria con la finalidad de controlar los niveles de carga biológica y como una medida de calidad en la producción de dichos productos.

5.3 PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN

Por definición, la esterilización es el proceso por el que todas las células, esporas viables y virus son destruidos o eliminados de un objeto o un hábitat. Un objeto esterilizado está totalmente libre de microorganismos viables y otros agentes infecciosos (*Prescott 2002*).

En la industria farmacéutica, la esterilización se aplica en sus productos farmacéuticos y partes que lo integran tales como envases, tapones, etc. así mismo, en instrumentos o bien en el material para pruebas de laboratorio, como es

el caso de control microbiológico, siendo los métodos de esterilización más usados el vapor bajo presión, calor seco, filtración, gas y radiación penetrante.

Al seleccionar un proceso de esterilización para un producto dado, se toman en cuenta sus características físicas y químicas, las condiciones de su fabricación y su estabilidad respecto al método escogido.

5.3.1 Esterilización por filtración

La filtración es un método excelente para esterilizar soluciones termosensibles. Más que destruir directamente a los microorganismos contaminantes, el filtro simplemente los retira de la solución.

Este método de esterilización básicamente consiste en la separación física de los microorganismos que contaminan ciertos productos farmacéuticos, por adsorción sobre membranas filtrantes de diferente composición y tamaño de poro (*Remington 2003*).

De manera más específica, la filtración por membrana se basa en la retención física del microorganismo en la membrana filtrante, mientras que el agente antimicrobiano y el resto de la formulación (excipientes y principio activo) pasa a través del filtro hacia el filtrado. Luego se incubaba la membrana para la recuperación de los microorganismos viables. Sin embargo, la adherencia de los agentes antimicrobianos residuales a la membrana puede inhibir el crecimiento. La filtración a través de materiales filtrantes de poca capacidad de unión, tales como el difluoruro de polivinilideno, ayuda a minimizar esta inhibición de crecimiento. Además el conservador puede diluirse o eliminarse del filtro por lavado con un líquido propicio (**USP 32** *Validación de recuperación microbiana <1227>*).

El proceso de esterilización de soluciones mediante filtración ha mejorado mucho en la actualidad, principalmente como resultado del desarrollo y la proliferación de la tecnología de filtros de membrana. Esta clase de medios de filtración se presta a una estandarización y control de calidad más eficaces y también permite al usuario más oportunidades para confirmar las características o propiedades de la

unidad del filtro antes y después de su uso. El hecho de que los filtros de membrana sean películas poliméricas delgadas ofrece muchas ventajas pero también algunos inconvenientes cuando se comparan con los filtros de profundidad como los de porcelana o de material sinterizado.

Puesto que gran parte de la superficie de la membrana es un espacio vacío o abierto, el filtro ensamblado y esterilizado adecuadamente ofrece la ventaja de una velocidad de flujo alta. Una desventaja es que, debido a que la membrana suele ser frágil, es esencial verificar que el ensamblaje se haga correctamente y que la membrana no sufra roturas durante su ensamblaje, esterilización o uso.

Dado que la eficacia del proceso de filtración también está influenciada por la carga microbiana de la solución a filtrar, un aspecto importante de la validación del proceso de filtración es determinar la cantidad de microorganismos que contienen las soluciones antes de la filtración. La filtración con fines de esterilización generalmente se lleva a cabo con unidades que tienen membranas cuya clasificación por tamaño de poro nominal es de 0.2 μm de diámetro, debido a que eliminan células bacterianas y fúngicas, aunque no virus (**USP 32 Esterilización y Garantía de esterilidad <1211>**).

Los filtros de membrana más utilizados son de acetato de celulosa, nitrato de celulosa, policarbonato, fluoruro de polivinilo u otros materiales sintéticos, tienen forma circular y un grosor aproximadamente de 0.1 mm (Figura 1a). La integridad inicial de las unidades de filtro de membrana debe probarse antes de su uso, siempre que la prueba no afecte la validez del sistema, y después del proceso de filtración para demostrar que la integridad de la unidad se mantuvo durante todo el procedimiento de filtración (**USP 32 Esterilización y Garantía de esterilidad <1211>**).

Con filtros adecuados se obtienen filtrados sin gérmenes, libres de partículas, sin alteración sustancial en su composición. En la práctica, los filtros, los recipientes que reciben el filtrado y cualquier accesorio necesario, se esterilizan previamente

usando el método apropiado (autoclave o por medio de calor seco), a la naturaleza de los componentes del sistema.

La filtración con membrana ofrece la ventaja sustancial de operar a temperatura ambiental sin ninguno de los efectos nocivos de la exposición al calor o a un gas esterilizante.

La esterilización por filtración involucra la transferencia del producto estéril terminado a envases previamente esterilizados, usando técnicas asépticas.

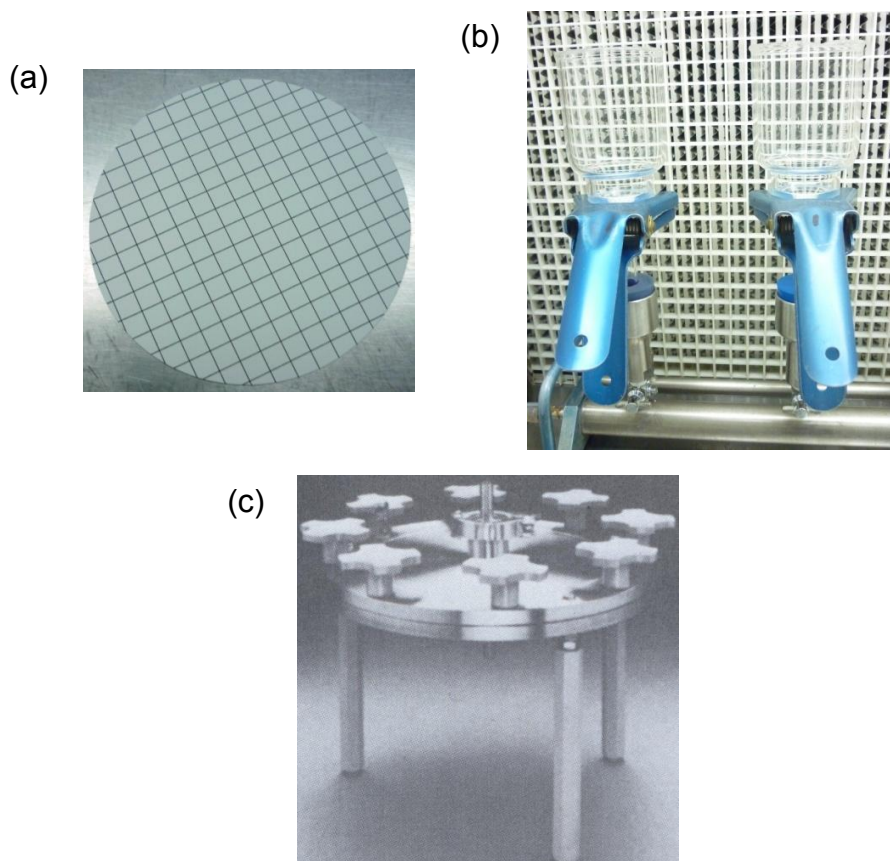


Figura 1 (a) membranas de filtración, (b) y (c) unidades de filtración.

5.4 CONTROL MICROBIOLÓGICO POR AGENTES QUÍMICOS.

La conservación de un producto ya sea una formulación farmacéutica, un producto cosmético o un alimento, involucra la adición de un agente químico, con el fin de inhibir la contaminación y proliferación microbiana y así evitar el deterioro del producto.

5.4.1 Conservadores antimicrobianos

Los conservadores antimicrobianos son sustancias que se añaden a las formas farmacéuticas no estériles para protegerlas del crecimiento microbiano o de los microorganismos que se introducen de modo inadvertido durante o después del proceso de manufactura (*Thompson 2006*). En el caso de soluciones estériles envasadas en recipientes de dosis múltiple, se agregan dichos conservadores para inhibir el crecimiento de microorganismos que podrían ser introducidos por la repetida extracción de dosis individuales, en cambio, en soluciones oftálmicas preparadas y envasadas para una sola aplicación, es decir, una dosis unitaria o monodosis, no necesitan tener conservador puesto que no están destinadas a reusarse.

Los conservadores antimicrobianos no deben emplearse en lugar de las buenas prácticas de fabricación o solamente para reducir la población microbiana viable de un producto no estéril o para conservar la biocarga antes de la esterilización de formulaciones multidosis durante la fabricación (**USP 32 Pruebas de eficacia antimicrobiana <51>**).

La eficacia de los conservadores depende en gran medida de la naturaleza y el número de microorganismos contaminantes, y especialmente de la presencia o ausencia de endosporas bacterianas, que son mucho más resistentes que las células vegetativas.

5.4.2 Compuestos de amonio cuaternario (CAC): cloruro de benzalconio

En específico, los compuestos de amonio cuaternario (CAC), son compuestos tensoactivos que contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, y por lo tanto tienden a migrar hacia superficies e interfases y se clasifican como tensoactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos de acuerdo a como se encuentre ionizado el grupo hidrofílico (*Russell 1977*).

Estos tensoactivos presentan numerosas aplicaciones dentro de la tecnología farmacéutica como agentes humectantes, detergentes, emulgentes, agentes de disolución y, en el caso de tensoactivos catiónicos, como antibacterianos.

Al parecer, para que este tipo de compuestos presente una actividad bactericida adecuada, es necesario que al menos uno de los sustituyentes en el átomo de nitrógeno tenga una cadena con una longitud de 8-18 átomos de carbono.

Los CAC, tienen una actividad antimicrobiana relativamente estrecha en contra de bacterias Gram positivas, y en bacterias Gram negativas, especialmente en *Pseudomonas aeruginosa*, es significativamente menor, así mismo, cuando estos compuestos se encuentran en concentraciones bajas se comportan como bacteriostáticos y carecen de actividad esporicida; son relativamente inactivos frente a virus, pero tienen una buena actividad contra determinadas especies de hongos.

Los tensoactivos catiónicos son menos activos a pH bajo, en especial por debajo de un pH de 3 a 5, de hecho, son más eficaces en soluciones neutras o ligeramente alcalinas y son incompatibles con los colorantes ácidos.

Los tensoactivos cationicos de uso común por sus propiedades antibacterianas incluyen el cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloruro de cetilpiridinio.

Como ya se mencionó anteriormente, el cloruro de benzalconio es un CAC y se caracteriza por poseer nitrógeno cuaternario cargado positivamente y una cadena alifática hidrófoba larga.

El cloruro de benzalconio es inefectivo contra algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo, combinado con el edetato disodico (0,01-0,1%), la actividad contra *P.aeruginosa* se incrementa. (Raymond, 2003).

Por otra parte, el cloruro de benzalconio es relativamente inactivo contra esporas y algunas especies de hongos. Se desconoce su modo de acción, pero lo más probable es que afecte la membrana citoplasmática y altere la permeabilidad de la célula. (Tortora, 2007).

5.4.3 Mercuriales orgánicos: Timerosal

Los mercuriales orgánicos tienen una menor concentración de iones de mercurio, y por lo tanto son menos corrosivos, irritantes y tóxicos que el cloruro de mercurio. El timerosal es un organomercurial con actividad bacteriostática y antifúngica; no es efectivo contra microorganismos formadores de esporas y es usado como una alternativa del cloruro de benzalconio y otros conservadores fenilmercurícos en concentraciones de 0,005-0,02%.

5.4.4 Agentes neutralizantes

Los agentes neutralizantes pueden utilizarse para neutralizar la actividad de los agentes antimicrobianos.

Si un producto tiene propiedades antimicrobianas debido a la presencia de un conservador específico o debido a su formulación, esta propiedad antimicrobiana debe ser neutralizada para recuperar los microorganismos viables. Esta neutralización puede lograrse mediante tres métodos principalmente como:

(1) Inhibición química, (2) dilución y (3) filtración y lavado (**USP 32**, *Validación de recuperación microbiana <1227>*).

Los neutralizantes químicos en el líquido del enjuague pueden asegurar que los residuos antimicrobianos en la membrana no interfieran con la recuperación de microorganismos viables.

Cuadro 1 Agentes inactivantes*

Conservador	Agente inactivante
Alcoholes: Clorobutanol Feniletil alcohol	Polisorbato 20 u 80 al 10% Polisorbato 20 u 80 al 10%
Esteres: Metil p-hidroxibenzoato al 0,18% Propil p-hidroxibenzoato al 0,02%	Polisorbato 20 u 80 al 10% Lecitina al 0,07% y polisorbato 80 al 0,5%
Mercuriales: Nitrato o acetato fenil mercúrico al 0,002%	Lecitina al 0,5% y polisorbato 80 al 3%
Sales cuaternarias de amonio: Cloruro de benzalconio	Lecitina al 0,5% y polisorbato 80 al 3%
Penicilina	Penicilinasas
Sulfas	Acido para-amino benzoico (PABA)

*FUENTE: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Novena edición, MGA 0571. Límites microbianos.

Una posibilidad de eliminar la actividad antimicrobiana del producto de prueba, es emplear diluyentes y medios de cultivo adicionados de lecitina y polisorbato en las proporciones recomendadas (*ver cuadro 2*).

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Material de laboratorio y equipo.

Material estéril

- ◆ Cajas petri con Agar soya tripticaseína (AST)
- ◆ Cajas petri con Agar soya tripticaseína con lecitina (AST plus) para bacterias aeróbicas
- ◆ Cajas petri con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para hongos y levaduras
- ◆ Botella para cultivo Roux con Agar soya tripticaseína (AST)
- ◆ Puntas para micropipeta
- ◆ Tubos de ensaye de vidrio con tapón de rosca de 16 X150 mm
- ◆ Tubos de ensaye de vidrio con tapón de rosca de 25 x 200 mm
- ◆ Frascos de vidrio con tapa
- ◆ Pipetas graduadas de 10 mL
- ◆ Perlas de vidrio
- ◆ Embudo de filtración rápida
- ◆ Unidades de filtración
- ◆ Pinzas
- ◆ Membranas de filtración tamaño de poro 0.45 μ y 47 mm de diámetro.
ADVANTEC® CAT. A045H047A

Material no estéril

- ◆ Micropipeta 10-100 μ L. Gilson
- ◆ Asa bacteriológica
- ◆ Mechero de bunsen
- ◆ Gradillas
- ◆ Propipeta

Equipo

- ◆ Vortex. Genie 2
- ◆ Incubadora industrial Marca Figursa 30-35°C. Modelo IFD-180.
- ◆ Incubadora industrial Marca Figursa 20-25°C. Modelo IFD-180.
- ◆ Refrigerador. Marca Revco. Modelo RE11204A21.
- ◆ Campana de flujo laminar horizontal. Marca VECO. Modelo GHFL-A12.
- ◆ Contador de colonias. Marca Optical Word Ltd. Modelo ERMA
- ◆ Baño de agua. Marca Blue M.
- ◆ Espectrofotómetro UV-VIS. Marca Perkin Elmer. Modelo Lambda 2.
- ◆ Microscopio óptico. Marca CARL ZEISS. Modelo K-7.
- ◆ Parrilla con agitador. Marca VWR.

6.2 Material biológico, soluciones y medios de cultivo.

Material biológico

Los microorganismos de prueba utilizados durante la validación del método analítico son cepas ATCC provenientes de **MicroBioLogics™** y fueron los siguientes:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------|
| ◆ <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| ◆ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 9027 |
| ◆ <i>Escherichia coli</i> | ATCC 8739 |
| ◆ <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 |
| ◆ <i>Bacillus spizizenii</i> | ATCC 6633 |
| ◆ <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ATCC 16404 |

Medios de cultivo.

- ◆ Agar soya tripticaseína (AST). MERCK™. CAT. 1.05458.0500
- ◆ Lecitina SPECTRUM™. CAT. L1083.
- ◆ Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). DIBICO™. CAT. 10007-E

NOTA: *La preparación de los medios de cultivo se encuentra descrita en el **anexo I**.*

Soluciones

- ◆ Solución salina estéril al 0.85% NaCl
- ◆ Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 estéril (5mL/L)

NOTA: *Las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua purificada de acuerdo a lo descrito en el **anexo I**.*

6.3 Método

6.3.1 Preparación de suspensiones de cada microorganismo de prueba.

1. Suspensiones estandarizadas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Para el grupo de bacterias, se sembraron las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en placas de Agar Soya Tripticaseina, posteriormente se incubaron a una temperatura de 30-35°C durante un periodo de 24 horas.

En el caso de la levadura *Candida albicans*, la cepa ATCC, se sembró en placas de Agar Dextrosa Sabouraud y las condiciones de temperatura y tiempo de incubación fueron de 20-25°C durante 48 horas.

Una vez transcurrido los periodos de tiempo y bajo las condiciones de temperatura establecidas, tanto para el grupo de las bacterias como en el caso de la levadura, se recuperó el crecimiento con una asa estéril y se colocó en tubos de ensaye de 25 X 200 mm con tapón de rosca estériles que contenían solución salina estéril al 0.85%. Partiendo de la suspensión anterior, se preparó una suspensión aproximadamente al 60% de transmitancia a 580 nm, ajustando con solución salina estéril al 0.85% o con el crecimiento microbiano según se requiriera, diluir o concentrar la suspensión. La vigencia de estas suspensiones es de 2 meses a partir de su elaboración; bajo condiciones de refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C

Obtenidas las suspensiones a una transmitancia aproximada al 60%, se realizaron diluciones seriadas de cada microorganismo en tubos de ensaye estériles que contenían 9 mL de solución salina al 0.85%.

La cuantificación de los microorganismos presentes en las suspensiones se realizó por duplicado mediante el método de vertido en placa, el cual consistió en colocar 1 mL de las diluciones de microorganismos preparadas anteriormente sobre cajas petri estériles, verter aproximadamente de 25 a 30 mL de medio de cultivo Agar Soya Tripticaseína y con movimientos circulares distribuir uniformemente el medio sobre la caja petri; el medio gelificó a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron las placas en diferentes condiciones de tiempo y temperatura, para el grupo de bacterias la temperatura de incubación fue de 30-35°C durante 2 días y para la levadura *C. albicans* el tiempo de incubación fue de 3 días a una temperatura de 20-25°C.

Después del periodo de incubación, se realizó la cuenta de las UFC presentes en cada placa y se obtuvo un promedio, el cual permitió determinar la dilución y volumen en el que se encontraran alrededor de 10 -100 UFC.

2. Suspensión estandarizada de *Aspergillus brasiliensis*

Se inoculó la cepa ATCC de *Aspergillus brasiliensis* dentro de una botella Roux que contenía 250 mL de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubó a 20-25°C por un periodo de 7 a 10 días con la finalidad de obtener el mayor número de esporas.

Para remover las esporas contenidas en el ADS, se añadió aproximadamente de 10 a 15 mL de solución salina al 0.85% adicionada de polisorbato 80 al 0.05% y perlas de vidrio con el objetivo de desprender todo el crecimiento del medio de cultivo.

La suspensión obtenida se filtro a través de una gasa y un embudo de filtración rápida estériles, el filtrado se recolectó en un frasco estéril con tapa. La vigencia de esta suspensión es de 1 año a partir de su elaboración; bajo condiciones de refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C.

A partir de la suspensión inicial, se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensaye estériles que contenían 9 mL de solución salina al 0.85%.

La cuantificación de los microorganismos presentes en la suspensión se realizó por duplicado mediante el método de vertido en placa, el cual consistió en colocar 1 mL de las diluciones de microorganismos preparadas anteriormente sobre cajas petri estériles, verter aproximadamente de 25 a 30 mL de medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína y con movimientos circulares distribuir uniformemente el medio sobre la caja petri, el medio gelificó a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron las placas a una temperatura de 20-25°C durante 3 días.

Después del periodo de incubación, se realizó la cuenta de las UFC presentes en cada placa y se obtuvo un promedio, el cual permitió determinar la dilución y volumen en el que se encontraban alrededor de 10 -100 UFC.

3. Suspensión estandarizada de *Bacillus spizizenii*

La cepa ATCC *Bacillus spizizenii* se inoculó en una placa que contenía Agar Soya Trypticaseína e incubó a una temperatura de 30-35°C en un periodo de 18-24 h.

Se recuperó el crecimiento microbiano contenido en el agar adicionando aproximadamente 3 mL de solución salina al 0.85% estéril.

La suspensión obtenida anteriormente fue inoculada dentro de una botella Roux que contenía 250 mL de Agar Soya Trypticaseína, dejando incubar por un periodo de 7 a 14 días a una temperatura de 30-35°C.

El crecimiento microbiano obtenido fue resuspendido adicionando 35 mL de solución salina al 0.85% estéril, depositado en un frasco estéril y colocado en agitación constante durante aproximadamente 3 horas, se retiró de la agitación y a través de una gasa estéril se filtró la suspensión y se calentó a una temperatura de 70°C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo de calentamiento, inmediatamente

se colocó en refrigeración con la finalidad de detener el choque térmico y obtener así solo células esporuladas y destruir las células vegetativas. La vigencia de esta suspensión a partir de su elaboración es de 1 año; bajo condiciones de refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C.

La cuantificación de los microorganismos presentes en las suspensiones se realizó por duplicado mediante el método de vertido en placa, el cual consistió en colocar 1 mL de las diluciones de microorganismos preparadas anteriormente sobre cajas petri estériles, verter aproximadamente de 25 a 30 mL de medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína y con movimientos circulares distribuir uniformemente el medio sobre la caja petri, el medio gelificó a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron las placas a una temperatura de 30-35°C durante 2 días.

Después del periodo de incubación, se realizó la cuenta de las UFC presentes en cada placa y se obtuvo un promedio el cual permitió determinar la dilución y volumen en el que se encontraran alrededor de 10 -100 UFC.

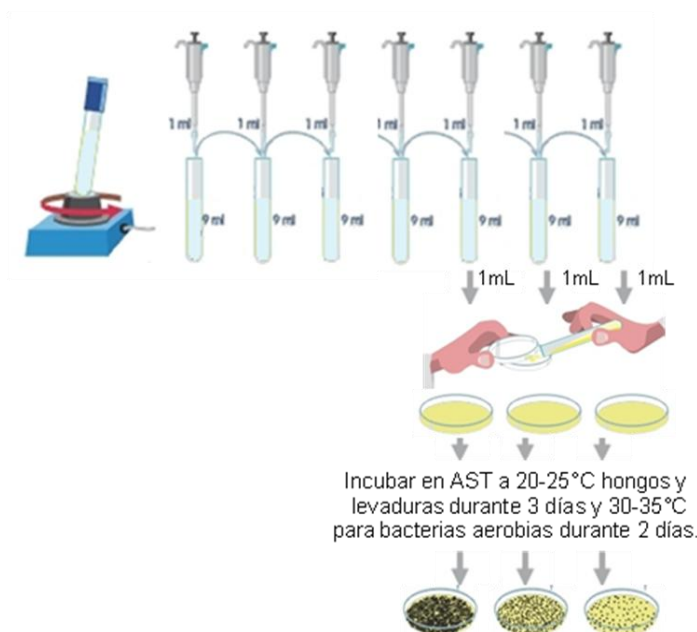


Figura 2 Cuantificación de microorganismos presentes en las suspensiones

6.3.2 Verificación del inóculo

La prueba se realizó por duplicado para los 6 microorganismos ATCC, esta determinación se basó en el método de extensión en superficie el cual consistió en preparar series de diluciones de cada microorganismo de prueba y dentro de cajas Petri que contenían AST depositar el volumen en el cual ya se había determinado que se encontraban concentraciones de alrededor de 10-100 UFC, por último, con ayuda de un asa bacteriológica estéril, dispersar sobre el medio el volumen anteriormente depositado.

Las condiciones de incubación fueron diferentes para hongos y levaduras (*Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans*) debido a que las placas se incubaron a 20-25°C durante 3 a 5 días, en tanto que para las bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*) la temperatura fue de 30-35°C durante 2 a 5 días.

Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó la cuenta por placa de UFC obteniendo un promedio y se registraron los datos.

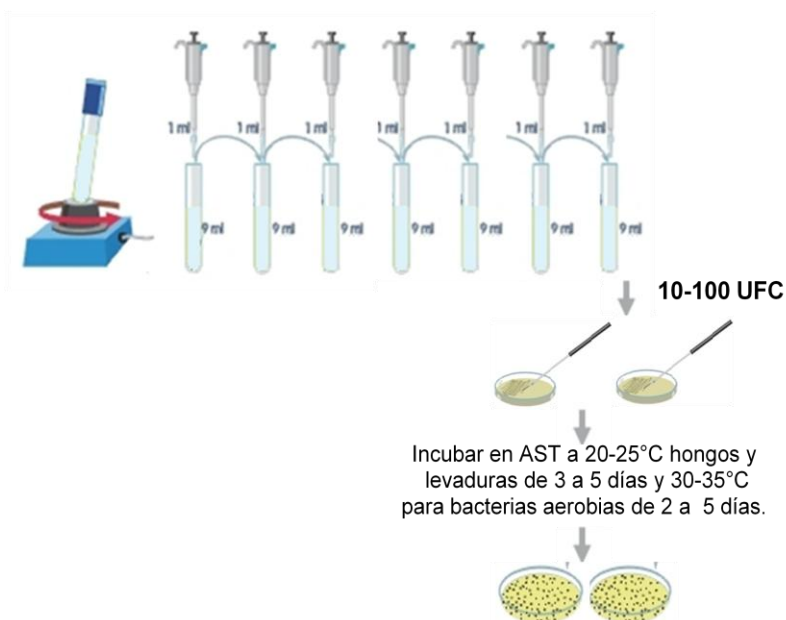


Figura 3 Verificación del inóculo mediante el método de extensión en superficie

6.3.3 Método de prueba: Validación de Bioburden

La validación del procedimiento analítico **ME.M95.2MTP.02000.R03 “Bioburden en producto a granel de soluciones”** (*ver anexo III*) para los productos de prueba de este trabajo, se realizaron bajo los lineamientos descritos de acuerdo al procedimiento **ME.M04.4VALMTP.0001 “Validación de la determinación de Bioburden en materia prima soluble y solución de productos antes de esterilizarse usando el método de filtración de membrana”** (*ver anexo II*), el cual se encuentra fundamentado en los criterios establecidos en la USP. Así mismo, las consideraciones que se tuvieron en cuenta durante el desarrollo experimental de este trabajo, fueron las siguientes:

- a. El volumen total de muestra utilizada para la validación de cada producto fue de **240 mL**, en este volumen se consideran los 6 microorganismos de prueba empleados, 2 controles y tres replicas de cada determinación.
- b. Se aplicaron los tres métodos para neutralizar las propiedades antimicrobianas (inhibición química, dilución y filtración y lavado) con la finalidad de garantizar que la recuperación de los microorganismos no se viera afectada por la acción del conservador presente en la formulación del producto a analizar.
- c. Los agentes neutralizantes utilizados fueron lecitina de soya y polisorbato 80 debido a que inactivan la actividad antimicrobiana tanto de compuestos de amonio cuaternario como de mercuriales, principales conservadores de los productos de prueba.
- d. Se utilizaron membranas de filtración de la marca ADVANTEC[®], tamaño de poro 0.45 μ y 47 mm de diámetro, estériles.

6.3.3.1 Problema

Bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, se ensambló una unidad de filtración y sobre ella se colocó una membrana estéril con unas pinzas estériles.

Una vez colocado lo anterior, se adicionan 90 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 y 10 mL de muestra de la solución oftálmica a analizar y se procede a filtrar el contenido total usando vacío.

Después de filtrada la muestra se realizaron dos lavados con 100 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 y un tercer lavado de 100 mL de la solución reguladora de fosfatos pH 7.2 adicionada con polisorbato 80 e inoculada con 10 a 100 UFC de uno de los 6 microorganismos de prueba, este proceso se repitió para cada microorganismo de prueba; al finalizar la filtración, se retiró la membrana de filtración con ayuda de unas pinzas estériles y se colocó sobre una caja petri con Agar Soya Trypticaseína adicionado con lecitina polisorbato (ASTplus) para bacterias e incubó de 30-35°C de 2 a 5 días. En el caso de hongos y levaduras el medio utilizado fue Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubó de 20-25°C de 3 a 5 días, después de este periodo, se realizó el conteo de UFC, se registró y se continuó incubando hasta cumplir 7 días desde el inicio de la prueba, día en que se realiza nuevamente la cuenta.

6.3.3.2 Control de cada microorganismo de prueba

Bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, se ensambló una unidad de filtración y sobre ella se colocó una membrana estéril con unas pinzas estériles.

Una vez colocado lo anterior, de manera individual y en una porción de 100 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 se adicionó entre 10 y 100 UFC de cada microorganismo de prueba. Se procedió a filtrar el enjuague

inoculado usando vacío, se retiró la membrana de filtración con unas pinzas estériles, y se colocó sobre una caja petri que contenía Agar Soya Trypticaseína adicionado con lecitina polisorbato (ASTplus), en el caso de las bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*), se incubaron a una temperatura de 30-35°C durante 2 a 5 días y para hongos y levaduras la membrana se colocó sobre cajas petri con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) e incubaron a una temperatura de 20-25°C durante 3 a 5 días, después de este periodo, se realizó el conteo de UFC, se registró y se continuó incubando hasta cumplir 7 días desde el inicio de la prueba, día en que se realiza nuevamente la cuenta.

6.3.3.3 Control de la muestra

Bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, se ensambló una unidad de filtración y sobre ella se colocó una membrana estéril con unas pinzas estériles.

Una vez colocado lo anterior, se adicionaron 90 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 y 10 mL de muestra de la solución oftálmica a analizar se procede a filtrar el contenido total usando vacío.

Después de filtrada la muestra se realizaron tres lavados con 100 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80, al finalizar la filtración se retiró la membrana de filtración con ayuda de unas pinzas estériles y se colocó sobre una caja petri con Agar Soya Trypticaseína adicionado con lecitina polisorbato (ASTplus) para bacterias e incubó de 30-35°C de 2 a 5 días.

En el caso de hongos y levaduras el medio utilizado fue Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubó de 20-25°C de 3 a 5 días, después de este periodo, se realizó el conteo de UFC, se registró y se continuó incubando hasta cumplir 7 días desde el inicio de la prueba, día en que se realiza nuevamente la cuenta.



Cuantificar las UFC obtenidas en las diferentes condiciones de prueba

Figura 4. Metodología para la validación de Bioburden.

7. RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación muestran las tres determinaciones realizadas de cada producto, teniendo en consideración que se tratan de productos con diferente conservador y formulación, así mismo, se anexa la verificación del inóculo del microorganismo de prueba cumpliendo con las especificaciones del procedimiento a validar (menos de 100 UFC).

PRODUCTO A

Prueba 1a.

Fecha de inicio del análisis : 04-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 11-nov-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 2 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	98	96	98	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	54	52	96	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	40	32	80	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	68	60	88	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	56	54	96	ADS/ 20-25°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	49	48	98	ADS/ 20-25°C	08-nov-2010	11-nov-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 3 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 1a

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	93	96	95	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	52	56	54	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	38	34	36	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	64	67	66	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	52	54	53	AST/ 20-25°C	08-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	47	45	46	AST/ 20-25°C	08-nov-2010

PRODUCTO A

Prueba 2a.

Fecha de inicio del análisis : 04-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 11-nov-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 4 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	98	92	94	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	54	50	93	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	40	34	85	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	68	62	91	ASTplus/ 30-35°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	56	46	82	ADS/ 20-25°C	08-nov-2010	11-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	49	45	92	ADS/ 20-25°C	08-nov-2010	11-nov-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 5 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2a

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	93	96	95	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	52	56	54	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	38	34	36	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	64	67	66	AST/ 30-35°C	08-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	52	54	53	AST/ 20-25°C	08-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	47	45	46	AST/ 20-25°C	08-nov-2010

PRODUCTO A

Prueba 3a.

Fecha de inicio del análisis : 09-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 16-nov-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 6 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	76	75	99	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	58	57	98	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	28	25	89	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	50	48	96	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	54	53	98	ADS/ 20-25°C	12-nov-2010	16-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	64	61	95	ADS/ 20-25°C	12-nov-2010	16-nov-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 7 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3a

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	78	75	77	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	53	56	55	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	24	27	26	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	47	49	48	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	52	55	54	AST/ 20-25°C	12-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	60	63	62	AST/ 20-25°C	12-nov-2010

PRODUCTO B

Prueba 1b.

Fecha de inicio del análisis : 11-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 25-nov-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 8 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	70	67	96	ASTplus/ 30-35°C	13-nov-2010	18-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	43	41	95	ASTplus/ 30-35°C	13-nov-2010	18-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	21	19	90	ASTplus/ 30-35°C	13-nov-2010	18-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	59	58	98	ASTplus/ 30-35°C	**	**
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	45	42	93	ADS/ 20-25°C	14-nov-2010	18-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	92	88	96	ADS/ 20-25°C	**	**

*CM: Control de microorganismo de prueba

(**) La prueba para *B. spizizenii* y *A. brasiliensis* se inició el día 18-nov-2010, se realizaron controles tanto de microorganismos como de la muestra. La primer lectura registrada se realizó el día 20-nov-2010 y 21-nov-2010 respectivamente y **se continuó incubando hasta el 25-nov-2010, no se observa diferencia con la primer lectura.**

Cuadro 9 Cuenta de la verificación del inoculo de prueba 1b

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	69	65	67	AST/ 30-35°C	13-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	44	43	44	AST/ 30-35°C	13-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	23	20	22	AST/ 30-35°C	13-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	60	58	59	AST/ 30-35°C	**
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	47	45	46	AST/ 20-25°C	14-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	94	91	93	AST/ 20-25°C	**

(**) La cuenta para *B. spizizenii* y *A. brasiliensis* se realizó el día 20-nov-2010 y 21-nov-2010 respectivamente.

PRODUCTO B

Prueba 2b.

Fecha de inicio del análisis : 11-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 25-nov-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 10 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	70	67	96	ASTplus/ 30-35°C	13-nov-2010	18-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	43	41	95	ASTplus/ 30-35°C	13-nov-2010	18-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	21	18	86	ASTplus/ 30-35°C	13-nov-2010	18-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	59	55	93	ASTplus/ 30-35°C	**	**
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	45	44	98	ADS/ 20-25°C	14-nov-2010	18-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	92	86	93	ADS/ 20-25°C	**	**

*CM: Control de microorganismo de prueba

(**) La prueba para *B. spizizenii* y *A. brasiliensis* se realizó el día 18-nov-2010, se realizaron controles tanto de microorganismos como de la muestra. La primer lectura registrada se realizó el día 20-nov-2010 y 21-nov-2010 respectivamente y se continuó y se continuó incubando hasta el 25-nov-2010, no se observa diferencia con la primer lectura.

Cuadro 11 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2b

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	69	65	67	AST/ 30-35°C	13-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	44	43	44	AST/ 30-35°C	13-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	23	20	22	AST/ 30-35°C	13-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	60	58	59	AST/ 30-35°C	**
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	47	45	46	AST/ 20-25°C	14-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	94	91	93	AST/ 20-25°C	**

(**) La cuenta para *B. spizizenii* y *A. brasiliensis* se realizó el día 20-nov-2010 y 21-nov-2010 respectivamente.

PRODUCTO B

Prueba 3b.

Fecha de inicio del análisis : 18-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 25-nov-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solución de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 12 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	48	45	94	ASTplus/ 30-35°C	20-nov-2010	25-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	52	49	94	ASTplus/ 30-35°C	20-nov-2010	25-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	16	14	88	ASTplus/ 30-35°C	20-nov-2010	25-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	59	56	95	ASTplus/ 30-35°C	20-nov-2010	25-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	49	43	88	ADS/ 20-25°C	21-nov-2010	25-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	92	84	91	ADS/ 20-25°C	21-nov-2010	25-nov-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 13 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3b

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	46	43	45	AST/ 30-35°C	20-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	53	53	53	AST/ 30-35°C	20-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	18	15	17	AST/ 30-35°C	20-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	60	58	59	AST/ 30-35°C	20-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	55	57	56	AST/ 20-25°C	21-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	94	91	93	AST/ 20-25°C	21-nov-2010

PRODUCTO C

Prueba 1c.

Fecha de inicio del análisis : 09-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 16-nov-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 14 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	76	73	96	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	58	52	90	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	28	26	93	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	50	48	96	ASTplus/ 30-35°C	11-nov-2010	16-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	54	48	89	ADS/ 20-25°C	12-nov-2010	16-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	64	62	97	ADS/ 20-25°C	12-nov-2010	16-nov-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 15 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 1c

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	78	75	77	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	53	56	55	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	24	27	26	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	47	49	48	AST/ 30-35°C	11-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	52	55	54	AST/ 20-25°C	12-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	60	63	62	AST/ 20-25°C	12-nov-2010

PRODUCTO C

Prueba 2c.

Fecha de inicio del análisis : 25-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 02-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 16 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	82	81	99	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	65	61	94	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	64	61	95	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	51	46	90	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	67	61	91	ADS/ 20-25°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	50	48	96	ADS/ 20-25°C	29-nov-2010	02-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 17 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2c

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	84	82	83	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	67	64	66	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	62	60	61	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	52	54	53	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	67	66	67	AST/ 20-25°C	29-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	51	49	50	AST/ 20-25°C	29-nov-2010

PRODUCTO C

Prueba 3c.

Fecha de inicio del análisis : 25-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 02-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 18 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	82	78	95	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	65	59	91	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	64	56	88	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	51	47	92	ASTplus/ 30-35°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	67	63	94	ADS/ 20-25°C	29-nov-2010	02-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	50	46	92	ADS/ 20-25°C	29-nov-2010	02-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 19 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3c

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	84	82	83	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	67	64	66	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	62	60	61	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	52	54	53	AST/ 30-35°C	29-nov-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	67	66	67	AST/ 20-25°C	29-nov-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	51	49	50	AST/ 20-25°C	29-nov-2010

PRODUCTO D

Prueba 1d.

Fecha de inicio del análisis : 30-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 07-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 20 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM*	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	88	84	95	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	35	31	89	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	46	43	93	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	45	41	91	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	60	54	90	ADS/ 20-25°C	03-dic-2010	07-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	51	48	94	ADS/ 20-25°C	03-dic-2010	07-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 21 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 1d

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	89	85	87	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	37	34	36	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	48	47	48	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	47	45	46	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	64	61	63	AST/ 20-25°C	03-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	52	49	51	AST/ 20-25°C	03-dic-2010

PRODUCTO D

Prueba 2d.

Fecha de inicio del análisis : 03-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 10-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 22 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	79	78	99	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	36	33	92	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	47	46	98	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	40	38	95	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	69	66	96	ADS/ 20-25°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	40	38	95	ADS/ 20-25°C	06-dic-2010	10-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 23 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2d

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA- UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	81	79	80	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	33	36	35	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	44	47	46	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	41	38	40	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	70	67	69	AST/ 20-25°C	06-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	36	40	38	AST/ 20-25°C	06-dic-2010

PRODUCTO D

Prueba 3d.

Fecha de inicio del análisis : 07-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 14-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 24 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	70	66	94	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	31	25	81	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	38	34	89	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	20	18	90	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	67	65	97	ADS/ 20-25°C	10-dic-2010	14-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	24	21	88	ADS/ 20-25°C	10-dic-2010	14-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 25 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3d

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	69	68	69	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	32	30	31	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	37	36	37	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	21	20	21	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	69	71	70	AST/ 20-25°C	10-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	24	25	25	AST/ 20-25°C	10-dic-2010

PRODUCTO E

Prueba 1e.

Fecha de inicio del análisis : 30-nov-2010

Fecha de termino del análisis : 07-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 26 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	88	74	84	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	35	33	94	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	46	40	87	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	45	43	96	ASTplus/ 30-35°C	02-dic-2010	07-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	60	55	92	ADS/ 20-25°C	03-dic-2010	07-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	51	50	98	ADS/ 20-25°C	03-dic-2010	07-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 27 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 1e

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	89	85	87	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	37	34	36	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	48	47	48	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	47	45	46	AST/ 30-35°C	02-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	64	61	63	AST/ 20-25°C	03-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	52	49	51	AST/ 20-25°C	03-dic-2010

PRODUCTO E

Prueba 2e.

Fecha de inicio del análisis : 03-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 10-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 28 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	79	72	91	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	36	30	83	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	47	43	91	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	40	34	85	ASTplus/ 30-35°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	69	68	99	ADS/ 20-25°C	06-dic-2010	10-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	40	35	88	ADS/ 20-25°C	06-dic-2010	10-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 29 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2e

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	81	79	80	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	33	36	35	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	44	47	46	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	41	38	40	AST/ 30-35°C	06-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	70	67	69	AST/ 20-25°C	06-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	36	40	38	AST/ 20-25°C	06-dic-2010

PRODUCTO E

Prueba 3e.

Fecha de inicio del análisis : 07-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 14-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 30 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	70	68	97	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	31	27	87	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	38	35	92	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	20	19	95	ASTplus/ 30-35°C	09-dic-2010	14-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	67	63	94	ADS/ 20-25°C	10-dic-2010	14-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	24	22	92	ADS/ 20-25°C	10-dic-2010	14-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 31 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3e

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	69	68	69	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	32	30	31	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	37	36	37	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	21	20	21	AST/ 30-35°C	09-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	69	71	70	AST/ 20-25°C	10-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	24	25	25	AST/ 20-25°C	10-dic-2010

PRODUCTO F

Prueba 1f.

Fecha de inicio del análisis : 01-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 08-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 32 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	61	58	95	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	35	31	89	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	49	46	94	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	36	32	89	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	67	65	97	ADS/ 20-25°C	04-dic-2010	08-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	55	51	93	ADS/ 20-25°C	04-dic-2010	08-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 33 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 1f

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	59	63	61	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	32	34	33	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	50	48	49	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	33	35	34	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	65	61	63	AST/ 20-25°C	04-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	53	56	55	AST/ 20-25°C	04-dic-2010

PRODUCTO F

Prueba 2f.

Fecha de inicio del análisis : 09-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 16-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 34 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	54	52	96	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	23	20	87	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	24	21	88	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	26	23	88	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	60	56	93	ADS/ 20-25°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	30	26	87	ADS/ 20-25°C	13-dic-2010	16-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 35 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2f

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	55	53	54	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	25	28	27	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	26	25	26	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	28	24	26	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	58	59	59	AST/ 20-25°C	13-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	30	32	31	AST/ 20-25°C	13-dic-2010

PRODUCTO F

Prueba 3f.

Fecha de inicio del análisis : 14-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 21-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 36 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	52	50	96	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	25	22	88	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	28	24	86	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	48	42	88	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	57	54	95	ADS/ 20-25°C	17-dic-2010	21-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	34	33	97	ADS/ 20-25°C	17-dic-2010	21-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 37 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3f

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	54	50	52	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	23	24	24	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	30	28	29	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	46	43	45	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	59	57	58	AST/ 20-25°C	17-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	36	34	35	AST/ 20-25°C	17-dic-2010

PRODUCTO G

Prueba 1g.

Fecha de inicio del análisis : 01-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 08-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 38 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	61	55	90	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	35	33	94	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	49	44	90	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	36	31	86	ASTplus/ 30-35°C	03-dic-2010	08-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	67	64	96	ADS/ 20-25°C	04-dic-2010	08-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	55	53	96	ADS/ 20-25°C	04-dic-2010	08-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 39 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 1g

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	59	63	61	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	32	34	33	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	50	48	49	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	33	35	34	AST/ 30-35°C	03-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	65	61	63	AST/ 20-25°C	04-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	53	56	55	AST/ 20-25°C	04-dic-2010

PRODUCTO G

Prueba 2g.

Fecha de inicio del análisis : 09-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 16-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 40 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	54	50	93	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	23	21	91	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	24	22	92	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	26	20	77	ASTplus/ 30-35°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	60	55	92	ADS/ 20-25°C	13-dic-2010	16-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	30	28	94	ADS/ 20-25°C	13-dic-2010	16-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 41 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2g

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	55	53	54	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	25	28	27	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	26	25	26	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	28	24	26	AST/ 30-35°C	13-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	58	59	59	AST/ 20-25°C	13-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	30	32	31	AST/ 20-25°C	13-dic-2010

PRODUCTO G

Prueba 3g.

Fecha de inicio del análisis : 14-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 21-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 42 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	52	48	92	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	25	28	92	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	28	27	96	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	48	40	83	ASTplus/ 30-35°C	16-dic-2010	21-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	57	52	91	ADS/ 20-25°C	17-dic-2010	21-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	34	31	91	ADS/ 20-25°C	17-dic-2010	21-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 43 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3g

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	54	50	52	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	23	24	24	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	30	28	29	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	46	43	45	AST/ 30-35°C	16-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	59	57	58	AST/ 20-25°C	17-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	36	34	35	AST/ 20-25°C	17-dic-2010

PRODUCTO H

Prueba 1h.

Fecha de inicio del análisis : 20-dic-2010

Fecha de termino del análisis : 27-dic-2010

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 44 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	55	53	96	ASTplus/ 30-35°C	22-dic-2010	27-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	47	44	94	ASTplus/ 30-35°C	22-dic-2010	27-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	44	41	93	ASTplus/ 30-35°C	22-dic-2010	27-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	30	27	90	ASTplus/ 30-35°C	22-dic-2010	27-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	51	50	98	ADS/ 20-25°C	23-dic-2010	27-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	43	40	93	ADS/ 20-25°C	23-dic-2010	27-dic-2010

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 45 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 1h

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	55	57	56	AST/ 30-35°C	22-dic-2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	47	49	48	AST/ 30-35°C	22-dic-2010
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	40	44	42	AST/ 30-35°C	22-dic-2010
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	31	27	29	AST/ 30-35°C	22-dic-2010
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	53	55	54	AST/ 20-25°C	23-dic-2010
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	43	47	45	AST/ 20-25°C	23-dic-2010

PRODUCTO H

Prueba 2h.

Fecha de inicio del análisis : 05-ene-2011

Fecha de termino del análisis : 12-ene-2011

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 46 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	58	55	95	ASTplus/ 30-35°C	07-ene-2011	12-ene-2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	43	41	95	ASTplus/ 30-35°C	07-ene-2011	12-ene-2011
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	21	19	90	ASTplus/ 30-35°C	07-ene-2011	12-ene-2011
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	41	39	95	ASTplus/ 30-35°C	07-ene-2011	12-ene-2011
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	42	38	90	ADS/ 20-25°C	08-ene-2011	12-ene-2011
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	72	69	96	ADS/ 20-25°C	08-ene-2011	12-ene-2011

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 47 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 2h

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	61	57	59	AST/ 30-35°C	07-ene-2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	45	45	45	AST/ 30-35°C	07-ene-2011
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	23	26	25	AST/ 30-35°C	07-ene-2011
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	42	40	41	AST/ 30-35°C	07-ene-2011
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	47	44	46	AST/ 20-25°C	08-ene-2011
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	65	69	67	AST/ 20-25°C	08-ene-2011

PRODUCTO H

Prueba 3h.

Fecha de inicio del análisis : 07-ene-2011

Fecha de termino del análisis : 14-ene-2011

Cantidad de muestra utilizada: 10 mL

Solucion de enjuague: Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80 (5mL/L).

Número de lavados : 3 lavados de 100 mL.

Cuadro 48 Recuperación de microorganismos mediante el método de filtración de membrana.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			% DE RECUPERACIÓN	MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE PRIMERA LECTURA	FECHA DE SEGUNDA LECTURA
	CONTROL PRODUCTO	CM *	PROBLEMA				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	61	57	93	ASTplus/ 30-35°C	10-ene-2011	14-ene-2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	21	21	100	ASTplus/ 30-35°C	10-ene-2011	14-ene-2011
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	18	16	89	ASTplus/ 30-35°C	10-ene-2011	14-ene-2011
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	0	34	33	97	ASTplus/ 30-35°C	10-ene-2011	14-ene-2011
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	48	42	88	ADS/ 20-25°C	10-ene-2011	14-ene-2011
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	0	62	59	95	ADS/ 20-25°C	10-ene-2011	14-ene-2011

*CM: Control de microorganismo de prueba

Cuadro 49 Cuenta de la verificación del inóculo de prueba 3h

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CUENTA-UFC/PLACA			MEDIO DE CULTIVO/ TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	FECHA DE LECTURA
	PLACA 1	PLACA 2	PROMED		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	58	61	60	AST/ 30-35°C	10-ene-2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	26	23	25	AST/ 30-35°C	10-ene-2011
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	20	18	19	AST/ 30-35°C	10-ene-2011
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	39	35	97	AST/ 30-35°C	10-ene-2011
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	52	48	50	AST/ 20-25°C	10-ene-2011
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	64	59	62	AST/ 20-25°C	10-ene-2011

Una vez terminado el análisis de los diferentes productos oftálmicos, se agruparon los porcentajes de la siguiente manera

Cuadro 50 Porcentajes grupales de cada producto analizado.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	% DE RECUPERACIÓN											
	PRODUCTO A			PRODUCTO B			PRODUCTO C			PRODUCTO D		
	PRUEBA											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	98	94	99	96	96	94	96	99	95	95	99	94
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	96	93	98	95	95	94	90	94	91	89	92	81
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	80	85	89	90	86	88	93	95	88	93	98	89
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	88	91	96	98	93	95	96	90	92	91	95	90
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	96	82	98	93	98	88	89	91	94	90	96	97
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	98	92	95	96	93	91	97	96	92	94	95	88
DICTAMEN	CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN			CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN			CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN			CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN		

El criterio de aceptación para dictaminar si cumple con la especificación es el siguiente:

Ausencia de inhibición si el porcentaje de recuperación es $\geq 70\%$.

Presencia de inhibición si el porcentaje de recuperación es $< 70\%$.

Como se observa en los resultados agrupados por porcentaje de recuperación, las tres determinaciones independientes para cada producto analizado es \geq al 70%, lo cual nos indica que no hay inhibición, por tanto cumple con el criterio de aceptación.

Cuadro 50 Porcentajes grupales de cada producto analizado

MICROORGANISMO DE PRUEBA	% DE RECUPERACIÓN											
	PRODUCTO E			PRODUCTO F			PRODUCTO G			PRODUCTO H		
	PRUEBA											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	84	91	97	95	96	96	90	93	92	96	95	93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	94	83	87	89	87	88	94	91	92	94	95	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	87	91	92	94	88	86	90	92	96	93	90	89
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	96	85	95	89	88	88	86	77	83	90	95	97
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	92	99	94	97	93	95	96	92	91	98	90	88
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	98	88	92	93	87	97	96	94	91	93	96	95
DICTAMEN	CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN			CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN			CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN			CUMPLE CON ESPECIFICACIÓN		

El criterio de aceptación para dictaminar si cumple con la especificación es el siguiente:

Ausencia de inhibición si el porcentaje de recuperación es $\geq 70\%$.

Presencia de inhibición si el porcentaje de recuperación es $< 70\%$.

Como se observa en los resultados agrupados por porcentaje de recuperación, las tres determinaciones independientes para cada producto analizado es \geq al 70%, lo cual nos indica que no hay inhibición, por tanto cumple con el criterio de aceptación.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión

Este trabajo experimental se basó en los procedimientos analíticos que habían sido desarrollados en el corporativo con anterioridad, y bajo las condiciones y productos que ahí se fabrican, en consecuencia era necesario corroborar que bajo las condiciones de prueba en Alcon México y fabricación local la metodología aplicada para la determinación de la carga microbiana fuera efectiva.

La determinación de la eficacia de recuperación es necesaria para la estimación de la población de microorganismos en un producto a granel, en este caso mediante filtración de membrana, lo cual es una parte de gran importancia para la validación de la metodología utilizada.

Cuando se está examinando el producto directamente es necesario asegurarse que no presente propiedades antimicrobianas ya que esto podría afectar los resultados, para ello se requiere de neutralizantes que nos permitan eliminar dichas propiedades, permitiendo así, el desarrollo de microorganismos que pudieran estar presentes en el producto como es el caso de la lecitina adicionada al medio de cultivo AST Plus.

Otro punto que se debe considerar para una adecuada recuperación de los microorganismos es el número de enjuagues o lavados y la solución de enjuague utilizada, ya que esto interviene en la posibilidad de que aún exista conservador proveniente del producto sobre la membrana, este cubriría la célula y por tanto puede presentarse una inhibición en el crecimiento microbiano, o bien, si no se mantiene una adecuada isotonicidad la célula se podría ver afectada por cambios en el equilibrio osmótico evitando así el crecimiento. Por lo anterior al evaluar la metodología también fueron sujetos a validación estos aspectos, demostrando que el número de enjuagues y la solución utilizada son los adecuados, ya que no interfirieron en la recuperación de los microorganismos.

Como se puede observar en los resultados obtenidos la recuperación de los microorganismos es mayor al 70%, aun cuando son productos que contienen diferentes conservadores y formulación.

La metodología se considera validada para los productos probados mientras no se cambien los parámetros de prueba, cualquier cambio deberá requerir un análisis y evaluación que demuestre la continuidad de la validación.

Conclusiones

- Mediante la evidencia documentada obtenida se demuestra que la metodología realizada de manera rutinaria en el laboratorio de control microbiológico para el análisis de Bioburden, como parte del control del proceso de fabricación de los productos estériles es capaz de detectar niveles bajos de microorganismos que pudieran estar presentes en el producto a granel probados en este trabajo.
- El ensayo se considera validado debido a que los productos cumplieron con los requerimientos de USP, porque se realizaron al menos tres determinaciones repetidas independientes y cada una demostró que el número de UFC recuperadas del problema con respecto al número de UFC recuperada en el control de microorganismos no es menor del 70% en los productos probados.
- La prueba de Bioburden quedo validada para los productos probados en este trabajo mediante el método de filtración de membrana.

9. BIBLIOGRAFÍA

Agalloco, James P. *Validation of pharmaceutical process. Sterile products*. United States of America: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.p. 1-16.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos FEUM, 9ª. Edición. <GENERALIDADES> p.p 7-10.

Farmacopea de los Estados Unidos USP 32, 2009. <61> EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES: PRUEBAS DE RECUENTO MICROBIANO. pp. 76-85.

Farmacopea de los Estados Unidos USP 32, 2009. <1211> ESTERILIZACIÓN Y GARANTÍA DE ESTERILIDAD DE ARTÍCULOS FARMACOPEICOS. pp. 787-793.

Farmacopea de los Estados Unidos USP 32, 2009. <1227> VALIDACIÓN DE RECUPERACIÓN MICROBIANA EN ARTÍCULOS FARMACOPEICOS. pp. 806-809.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Secretaria de Salud.

Prescott, Lansing M. *Microbiología*. España: Mc Graw Hill, 2002. pp. 149-159.

Raymond C. Rowe. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 5a. edición. Pharmaceutical Press. Londres. 2003. p.p 45-47, 648-650.

Remington, Alfonso Gennaro. *Farmacología*. Vol. 1. Médica Panamericana. Argentina, 2003. p.p. 961-966.

Russell. *Pharmaceutical microbiology*. Blacrwel Scientific Publications, 1977. pp. 155-184.

Thompson, Judith E. *Práctica contemporanea en farmacia*. México: Mc Graw Hill, 2006. p.p. 183-195, 383-390.

Tortora, Gerard J. *Introducción a la microbiología*. 9ª. Edición. Médica Panamericana. Argentina. 2007. p.p. 202-203.

10. MÉTODOS DE REFERENCIA

ME.M04.4VALMTP.0001 "Validación de la determinación de Bioburden en materia prima soluble y solución de productos antes de esterilizarse usando el método de filtración de membrana"

ME.M95.2MTP.02000.R03. "Bioburden en producto a granel de soluciones"

PROC-0001158. Validation of Bioburden assay using the membrane filtration method.

ANEXOS

ANEXO I.
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Preparación de soluciones

a. Solución salina estéril al 0.85%

Cloruro de sodio.....8,5 g
Agua purificada.....1000 mL

Se colocaron 8,5 g de cristales de cloruro de sodio en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en 1000 mL de agua purificada, de la solución anterior, se tomaron porciones de 9 mL y se depositaron en tubos de ensaye de 16x150 mm con tapa de rosca para su posterior esterilización en autoclave.

b. Solución hidróxido de sodio 1N.

Disolver 40 g de hidróxido de sodio grado industrial en 100 mL de agua. Guardar en contenedores de plástico bien cerrado. No se requiere determinar pH. La caducidad de esta solución será de 1 año.

c. Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 estéril (5mL/L)

1. Solución concentrada

Fosfato de potasio monobásico.....34,0 g
Agua purificada500 mL

En un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver el fosfato en el agua y ajustar el pH a $7,2 \pm 0,1$ con una solución de hidróxido de sodio 1N (aproximadamente 175 mL), aforar y mezclar.

Envasar en recipientes adecuados y esterilizar. Almacenar en refrigeración. Asignar 6 meses de caducidad y cada vez que se tome una alícuota tomarla en condiciones asépticas con puntas o pipetas estériles.

2. Solución de trabajo

Diluir 1,25 mL de la solución concentrada en 1000 mL de agua purificada. Envasar y esterilizar, verificar pH.

3. Solución reguladora de fosfatos p H 7,2, con polisorbato 80.

Preparar de acuerdo a la solución diluida (solución de trabajo) y adicionar 5 mL de polisorbato 80 por cada litro. Verificar pH.

Preparación de medios de cultivo

a) Agar Dextrosa Sabouraud

Formula: Gramos por litro de agua purificada.

Agar.....15,0

Dextrosa.....40,0

Peptona.....10,0

pH: 5.6 ± 0.2

Rehidratar 65 g del medio en un litro de agua purificada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar por autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. No sobreesterilizar para evitar caramelización de la Dextrosa. Enfriar aproximadamente a 45°C. Verter en cajas petri estériles.

b) Agar soya tripticaseína

Composición típica (g/litro)

Peptona de caseína..... 15,0

Peptona de harina de soja.....5,0

Cloruro sódico.....5,0

Agar-agar.....15,0

pH: 7.3 ± 0.2 a 25°C.

Disolver 40 g en 1 litro de agua purificada calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor; esterilizar en autoclave (15 min a 121°C).

ANEXO II.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO ME.M04.4VALMTP.0001

“Validación de la determinación de Bioburden en materia prima soluble y solución de producto antes de esterilizarse usando el método de filtración de membrana”

1. OBJETIVO

Validar la prueba para determinar la biocarga en materia prima soluble y productos solubles antes de esterilizarse por la técnica de filtración de membrana.

2. ALCANCE

Control Microbiológico

3. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del Químico Microbiólogo conocer y llevar a cabo la validación de la biocarga de las soluciones fabricadas en Alcon México.

Es responsabilidad del Jefe de Control Microbiológico conocer y verificar que se lleve a cabo este procedimiento.

4. INTRODUCCIÓN Y / O DEFINICIONES

Un producto puede poseer propiedades antimicrobianas porque en su formulación contiene algún preservativo, por lo tanto esta actividad antimicrobiana debe ser neutralizada para recuperar los microorganismos viables. Esta neutralización debe ser realizada usando un neutralizador específico, por dilución, por una combinación de lavado (filtración) y dilución, o por alguna combinación de estos métodos.

La validez de este conjunto de pruebas, se basa en su capacidad para poner en evidencia los microorganismos presentes en un producto farmacéutico.

Por esta razón, antes de establecer en forma rutinaria el análisis de un producto, es necesario demostrar que bajo las condiciones de prueba, es posible recuperar a los microorganismos controles previamente inoculados en la muestra.

5. MUESTRAS DE PRUEBA

10 g o mL de una muestra representativa de la materia prima soluble o producto antes de esterilizarse, esto para cada microorganismo de prueba.

6. MICROORGANISMOS DE PRUEBA

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6539 (Opcional para materias primas)

7. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

1. Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 (5 mL/L)
2. Solución de peptona al 0.5% de polisorbato 80 y 0.1% de lecitina (solución de enjuague universal)
3. Agar soya tripticaseína (AST)
4. Agar soya tripticaseína plus (AST plus) adicionado de inactivadores p.e. lecitina polisorbato para bacterias aeróbicas
5. Agar Dextrosa Sabouraud ó Agar Papa Dextrosa con cloramfenicol (50 mg/L) para hongos
6. Solución de enzima celulasa al 12% esterilizada por filtración
7. Solución salina (0.9% de NaCl)
8. Solución salina con 0.05% de polisorbato 80

8. MATERIAL Y EQUIPO

1. Contenedores para mezclado
2. Agitadores magnéticos
3. Unidades de filtración
4. Espátulas
5. Pipetas
6. Placas petri estériles
7. Membranas de filtración estériles de 0.45 µm.
8. Balanza granataria
9. Incubadora de 20°-25°C y 30°-35°C
10. Contador de colonias
11. Baño de agua 80°C
12. Campana de Seguridad Biológica

9. PROCEDIMIENTO

9.1 Preparación de los microorganismos

Microorganismos mantenidos en AST

1. Sembrar los microorganismo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* en Agar soya tripticaseína.

Nota: Cuando la materia prima requiera el análisis con *Salmonella typhi*, sembrar también sobre el AST.

2. Incubar a 30-35°C por 18 a 24 hrs.
3. Después del crecimiento recuperar la suspensión con solución salina estéril

Cultivo de Hongos y levaduras

1. Sembrar la *Candida albicans* sobre de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Incubar a 20-25°C por 48 horas, lavar la superficie con solución salina estéril para recuperar las células.
2. Mantener cultivos de *A. niger* sobre Agar Dextrosa Sabouraud. Después de incubarlas a 20-25°C de 6 -10 días. Recuperar las esporas con solución salina con 0.05% de polisorbato 80.

9.2 Preparación del inóculo

Preparar series de diluciones de cada microorganismo utilizando Solución Salina estéril para obtener concentraciones de 10-100 UFC/mL

9.3 Preparación de la muestra

Nota: Antes de realizar la validación del bioburden del material, se sugiere:

a) verificar con las otras plantas de Alcon si se cuenta con la validación del material a evaluar, esto con el fin de aprovechar las condiciones de prueba y aplicarlas directamente al estudio. b) revisar la metodología enviada por las otras plantas p.e. FWMDOC-00840 en la que se especifican las condiciones de prueba de algunos materiales.

Materia prima

1. Por cada microorganismo adicionar 10 gramos de materia prima al buffer de 90 ml de la solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 (solución de trabajo). Si la dilución 1:10 es viscosa hacer otra dilución 1:10.

Nota: Pueden utilizarse pequeños tamaños de muestra cuando el costo de la materia prima es alto, en tanto que la dilución 1:10 se mantenga o la muestra de prueba sea de 1 g o mL.

2. Mezclar bien para disolver
3. Por cada muestra preparada ensamblar la unidad de filtración previamente humedecida con 20 mL de solución de enjuague.

Solución de Productos antes de esterilizarse

1. Colectar la solución del producto antes de esterilizar en un matraz estéril.
2. Agitar para que toda la solución se encuentre homogénea.
3. Adicionar 10 mL del producto a un frasco con 90 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 (solución de trabajo). Por cada muestra a analizar, ensamblar la unidad de filtración previamente humedecida con aproximadamente 20 mL de la solución de enjuague.

Nota: Si la muestra contiene polímero de celulosa, adicionar 1 mL de la solución de celulosa al 12% estéril a 89 mL del buffer de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80. Adicionar a esta mezcla los 10 mL del producto. Mezclar bien y proseguir con la prueba.

9.3 Procedimiento de prueba

1. Por cada microorganismo que se va a retar, filtrar el total del contenido de la solución de trabajo usando vacío.
2. Después de filtrada la muestra lavar por lo menos dos veces con 100 ml de la solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 (5 mL/L) para los productos de soluciones antes de esterilizarse ó al menos una vez para soluciones de materias primas para eliminar cualquier sustancia que pudiera estar presente en la muestra.
3. Inocular la tercera y/o última solución de lavado con 10 a 100 UFC de cada microorganismo prueba y filtrar.
4. Colocar la membrana con pinzas estériles sobre una placa de Agar Soya Trypticaseína para bacterias y sobre Agar Dextrosa Saboraud para hongos y levaduras. Evitar la formación de burbujas atrapadas por debajo de la membrana.

5. Incubar la placas a la temperatura adecuada, AST a 30-35°C durante 7 días y ADS a 20-25°C durante 7 días.
6. Contar todas las colonias de la placa.
7. Si se tiene alguna duda con respecto a los microorganismos recuperados, comparar la morfología macroscópica y/o microscópica con respecto a los controles de cada microorganismo de prueba, o en su caso resebrar en medios selectivos y/o diferenciales para hacer evidentes las características morfológicas del microorganismo de prueba.

9.5 Control para cada microorganismo de prueba.

1. Realizar el mismo procedimiento de prueba pero sin adicionar producto.
2. Inocular la solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 con 10-100 UFC del microorganismo y filtrar utilizando vacío.
3. Dependiendo del microorganismo utilizar el medio adecuado y las condiciones de incubación adecuadas como está descrito en el punto 9.4.
4. Después del período de incubación contar y reportar.

9.6 Control de la muestra.

1. Realizar un bioburden de la muestra sin inocular para la materia prima o solución de producto antes de esterilizar.
2. Realizar la prueba bajo las mismas condiciones de análisis.

10. RESULTADOS

1. Calcular el número microorganismos presentes en la muestra del producto inoculado, los controles para cada microorganismo y el control de la muestra.

2. Compare el número de microorganismos sobrevivientes de la muestra del producto, el de la cuenta de los controles de microorganismos y el control de la muestra.
3. Anotar la presencia de actividad inhibitoria si existe diferencia significativa entre la muestra inoculada, los controles de microorganismos y el control de la muestra. Se considera presencia de inhibición si las cuentas viables del material de prueba son menores que el 70% de las cuentas viables de los controles de microorganismos.
4. Anotar la ausencia de inhibición si la diferencia no es significativa entre la muestra, los controles de microorganismos y el control de la muestra. Se considera ausencia de inhibición si la cuenta del material de prueba es por lo menos 70% del de la cuenta de los controles de los microorganismos.
5. Si al finalizar el procedimiento se determina actividad inhibitoria a alguno de los microorganismos control, modificar el procedimiento considerando las siguientes posibilidades.
 - 5.1 Aumentar el volumen del diluyente (número de lavados) manteniendo constante la cantidad del producto.
 - 5.2 Neutralizar la acción del agente preservativo. Por ejemplo utilizar solución de peptona con 0.5% de polisorbato 80 y 0.1% de lecitina como enjuague Universal, usar Agar Soya Trypticaseína (plus) adicionado de lecitina y polisorbato 80, uso de algún agente inactivante específico (tabla 1).
 - 5.3 Combinación de los dos procedimientos anteriores.

Tabla 1.

PRESERVATIVO	AGENTE INACTIVANTE
ALCOHOLES	
Clorbutanol	Polisorbato 20 o 80 al 10%
Feniletíl alcohol	Polisorbato 20 o 80 al 10
ESTERES	
Metil p-hidroxibenzoato al 0.18%	Polisorbato 20 o 80 al 5%
Propil p-hidroxibenzoato al 0.02%	Lecitina al 0.07% y polisorbato 80 al 0.5%
MERCURIALES	
Nitrato o acetato fenil mercúrico al 0.002%	Lecitina al 0.5% y polisorbato 80 al 3%
SALES CUATERNARIAS DE AMONIO	
Cloruro de benzalconio	Lecitina al 0.5% y polisorbato 80 al 3%
PENICILINA	Penicilinasas
SULFAS	Acido para-amino benzoico (PABA)

5.4 Como se observa en la tabla 1 la lecitina de soya y el polisorbato son sustancias que inactivan a la mayoría de los preservativos empleados en la industria farmacéutica, por lo tanto una posibilidad de eliminar la actividad antimicrobiana del producto de prueba, es emplear diluyentes y medios de cultivo adicionados de lecitina y polisorbato en la proporciones recomendadas.

5.5 Si la recuperación de los microorganismos control es satisfactoria, en los análisis sucesivos del producto o materia prima, emplear los medios y soluciones utilizados.

5.6 Si a pesar de la incorporación de los agentes neutralizantes o el aumento de volumen del diluyente o lavados, los microorganismos control no se recuperan y la naturaleza del producto no permite aplicar el método de filtración, se puede asumir que la actividad bactericida del producto no permitirá el desarrollo de bacterias relacionadas con los microorganismos control probados. Sin embargo, se debe obtener mayor información que permita establecer el espectro de actividad antimicrobiana del producto.

11. DOCUMENTACION.

Elaborar un reporte técnico con los resultados incluyendo toda la información de los medios de cultivo, reactivos, equipos, etc. que se utilizaron durante la prueba. Anexar copia de bitácoras si es necesario.

Este reporte debe ser entregado al área de documentación para su resguardo.

12. REFERENCIAS

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Séptima Edición, MGA 0381 Esterilidad, MGA 0571 Límites Microbianos.

ME.M95.2MTP.02000, Bioburden en producto a granel de soluciones

FWMDOC-00840, Bioburden Determination of Soluble Raw Materials and Bulk Product Solutions.

PROC-0001158. Validation of bioburden determination of soluble raw material and presterilized product solutions using a membrane filtration method.

USP 27, (1227) Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles

13. REFERENCIA CRUZADA

N/A

ANEXO III.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO ME.M95.2MTP.02000.R03 “Bioburden en producto a granel de soluciones”

I. OBJETIVO

Describir la metodología de muestreo y análisis de los productos a granel en solución para evaluar la carga bacteriana aeróbica y hongos de soluciones no estériles.

II. ALCANCE

Control Microbiológico.

III. RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del Químico Microbiólogo seguir este procedimiento.

Es responsabilidad del Jefe de Control Microbiológico el dar a conocer y garantizar que el procedimiento se lleve a cabo.

Es responsabilidad del Supervisor de fabricación el coordinar a su personal para que tomen las muestras para el bioburden y las entreguen en Control Microbiológico.

IV. DEFINICIONES

Bioburden: Carga microbiana inicial.

Solución: Mezcla líquida homogénea de dos o más sustancias.

V. CANTIDAD DE MUESTRA

100 mL colectada asépticamente.

VI. MATERIALES Y EQUIPO

1. Solución de lavado.

Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con polisorbato 80 (5 ml/l).

2. Medios.

Agar Soya Trypticaseína Plus (AST) adicionado de inactivadores p.e lecitina-polisorbato.

Nota: La USP recomienda lecitina de soya 0.5% (5 g por L) y Polisorbato 20 al 4.0% (40 mL por L).

Agar Dextrosa Sabouraud (ADS).

3. Materiales.

Matraz o frasco estéril para muestras con capacidad mínima de 250 mL, estériles.

Frascos con 300 mL de solución de lavado estéril. (Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 con Polisorbato 80).

Cajas Petri con Agar Soya Trypticaseína Plus (AST) adicionado con lecitina.

Cajas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS).

Membranas con poro de 0.45 μ y 47 mm de diámetro, estériles.

Pinzas para membrana estériles.

4. Equipo.

Balanza granataria.

Campana de flujo laminar.

Incubadoras a temperaturas de 30 - 35° C y de 20 - 25° C respectivamente.

Sistema para vacío.

Contador de colonias.

Unidad de filtración estéril (con vasos de filtración, soporte para filtro y pinzas; Manifold).

VII. PROCEDIMIENTO

A. Muestreo.

1. La muestra se tomará antes de la esterilización por filtración.
2. El personal deberá emplear cofia, cubreboca y guantes.
3. Abrir la válvula del tanque y tomar la muestra asépticamente.

4. Tomar 100 mL de producto en una botella o matraz estéril y rotularla con el nombre del producto, lote, fecha de fabricación y número de tanque. Anotando además la fecha y hora de muestreo.

B. Análisis.

1. Subir la muestra al laboratorio de Control Microbiológico y mediante el método de filtración por membrana realizar el análisis.
2. El análisis deberá ser realizado dentro de las 24 horas siguientes a la toma de la muestra manteniéndola en refrigeración hasta el momento de realizarlo.
3. En la campana de flujo laminar, armar el sistema de filtración estéril y colocar una membrana estéril. Sanitizar con un desinfectante y dejar actuar.
4. Usando cubrebocas y guantes adicionar 10 g o mL de la muestra a 90 mL de solución reguladora de fosfatos con polisorbato 80 en un contenedor estéril.
5. Transferir la solución a la unidad de filtración y filtrar usando vacío.
6. Enjuagar la membrana con 300 mL de solución de lavado estéril (solución reguladora de fosfatos con polisorbato 80) para asegurar la remoción de sustancias inhibitorias que puedan estar presentes en la muestra.
7. Empleando pinzas estériles, colocar la membrana en una caja con Agar Soya Trypticaseína-lecitina polisorbato. Evitar la formación de burbujas atrapadas por debajo del filtro.
8. Repetir el punto anterior y colocar la membrana en una caja con Agar Dextrosa Sabouraud.
9. Incubar la caja petri con Agar Soya Trypticaseína a 30 - 35°C durante 7 días y la caja con Agar Dextrosa Sabouraud a 20 - 25°C durante 7 días.
10. Contar todas las colonias de cada placa.
11. Si el número de colonias no pueden ser fácilmente contadas, cuente horizontalmente 7 cuadros consecutivos y verticalmente 6 cuadros consecutivos en ángulo recto.
12. Calcule el número de colonias/filtro multiplicando la suma de la cuenta de los 13 cuadros por el factor F. Siendo F el número total de cuadros por filtro dividido entre 13.

13. Colonias extendidas - cuente cuadros representativos sólo cuando:

- a) Las colonias están bien distribuidas en cuadros libres.
- b) Los cuadros cubiertos por la extensión no excede la mitad del área del filtro.

14. Si el filtro es incontable debido a un goteo accidental o contaminación extraña, registrarlo como “accidente de laboratorio” o “error de laboratorio”.

15. Registre el número de colonias por placa.

C. Evaluación de Resultados.

1. Cálculo de la carga del filtro. Si el bioburden excede especificaciones, realizar el cálculo de la carga del filtro obteniendo información con el supervisor de fabricación como: tipo de filtro, dimensiones del filtro etcétera.

- a) Convertir el volumen del granel a mililitros.
 - b) Convertir el total del área esterilizante del filtro a centímetros cuadrados.
 - c) Multiplicar el bioburden en UFC/mL por el total del volumen de granel en mililitros. El resultado es el bioburden total.
 - d) Dividir el bioburden total por el número obtenido en (b), el área total esterilizante en centímetros cuadrados. El resultado es la carga de bioburden por centímetro cuadrado de filtro esterilizante.
 - e) Dividir la capacidad mínima válida del filtro por la carga de bioburden.
 - f) El resultado final es un factor. Si este es positivo, la capacidad válida del filtro excede la carga de bioburden y no hay un impacto en el producto. Si este es negativo, la carga de bioburden excede la capacidad validada del filtro y se debe iniciar una investigación.
2. Informar al supervisor de fabricación si el bioburden excede las especificaciones. Documentar.

D. Tendencia de Bioburden.

1. Cuando un bioburden excede especificaciones realizar un análisis de tendencia de los últimos 10 lotes del producto fabricados en ese reactor para registro del laboratorio.

2. Si la tendencia muestra que dos resultados fallan en los últimos 10 lotes del producto fabricado en ese reactor, hay una tendencia negativa y se deberá iniciar la investigación correspondiente. Documentar.

X. RESULTADOS

1. Calcule el bioburden total por mL de muestra.
2. Reporte el resultado en el reporte correspondiente de QIS.

XI. REFERENCIA

Bioburden Determination of Soluble Raw Materials and Bulk Product solutions.
FW.MDOC-00840