



*“Validación del esquema de neutralización para la determinación de micro-organismos específicos Escherichia coli; Salmonella spp; Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus en solución oral, jarabe, tableta, crema, sin propiedades antimicrobianas”*

## **INVESTIGADOR**

Licda. Gracia Rocio Magaña de Gómez

## **PANEL DE ÁRBITROS**

Licda. Aída Mejía de Gutiérrez

Coordinadora del Laboratorio de Control de Calidad de Análisis Microbiológico de la DNM.

Licda. Rosa Francisca Umaña de Aguilar.

Coordinadora del área Microbiología Medicamentos Ministerio de Salud

Licda. Claudia Méndez de Alvarenga.

Analista de Pruebas microbiológicas Microbiología Medicamentos Ministerio de Salud

Lic. Ricardo Alberto Campos.

Analista de Pruebas microbiológicas Microbiología Medicamentos Ministerio de Salud

Lic. Eliú Alvarez Umaña

Analista de Pruebas microbiológicas Microbiología Medicamentos Ministerio de Salud

## **OPONENTE**

Licda. Julia Guadalupe Pérez de Sigüenza;

Técnico Especialista en Microbiología de la Dirección Nacional de Medicamentos.

## **Resumen**

Esta investigación presenta evidencias de la validación del esquema de neutralización de la prueba microbiológica para la determinación de microorganismos específicos tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. El esquema sigue las pautas establecidas en el Formulario Nacional de la Farmacopea de los Estados Unidos de América, NF 2021. Como primer punto, se efectúa la prueba de aptitud del método, verificando experimentalmente si se logra una buena neutralización por alguno de los siguientes medios: aumento del volumen del diluyente, incorporación de agentes neutralizantes, filtración por membranas, o una combinación de todos los anteriores. Al encontrar resultados satisfactorios en la prueba de aptitud, se realiza la validación del esquema de neutralización, para ello se emplea el análisis estadístico ANOVA. Los datos obtenidos son analizados según especificaciones establecidas, se reflejan en el informe de validación que muestra el resultado final del estudio, y la verificación de que el método propuesto es adecuado para el uso previsto.

Palabras clave: análisis, validación, microorganismos específicos.

## **Summary**

This research presents evidence of the validation of the neutralization scheme of the microbiological test for the determination of specific microorganisms such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The scheme follows the guidelines established in the National Form of the Pharmacopeia of the United States of America, NF 2021. As a first point, the aptitude test of the method was carried out, experimentally verifying if a good neutralization is achieved by any of the following means: increase in volume of diluent, incorporation of neutralizing agents, membrane filtration or a combination of all of the above. Upon finding satisfactory results in the aptitude test, the validation of the neutralization scheme is carried out, for this, the statistical analysis ANOVA is used. The data obtained are analyzed according to established specifications, are reflected in the validation report that shows the result of the study, and the verification that the proposed method is suitable for the intended use.

**Keywords:** analysis, validation, specific microorganisms.



## INTRODUCCIÓN

Las determinaciones de calidad microbiológica realizadas a los medicamentos son fundamentales para determinar si el producto es apto para el consumo humano, es por ello que los laboratorios dedicados a los análisis microbiológicos validan sus métodos, no solo con el fin de cumplir con las regulaciones de las buenas prácticas<sup>1</sup> si no, para tener el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporcionar un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo<sup>2</sup>, esto beneficia a la población debido a que se asegura productos libres de microorganismos dañinos a la salud, especialmente para la población más vulnerable como lo son lactantes, niños, ancianos, embarazadas y personas inmunodeprimidas<sup>3</sup>.

La siguiente investigación pretende encontrar y validar el esquema de neutralización, para eliminar los falsos negativos que podrían resultar de un inadecuado tratamiento de la muestra en la detección de microorganismos específicos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. En las matrices de soluciones, jarabes, tabletas, cremas sin propiedades antimicrobianas.

Dicha validación se basará en las recomendaciones descritas en la Farmacopea de los Estados Unidos de América Formulario Nacional, NF 2021<sup>4</sup> párrafos <62> y <1227>, utilizando aumentos de volúmenes de diluyente o medio de cultivo; incorporación de agentes neutralizantes generales o específicos en el diluyente; filtración por membrana, o una combinación de todas las anteriores, para poder asegurar resultados satisfactorios en las pruebas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Validar el esquema de neutralización para la determinación de microorganismos Específicos *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; en soluciones orales, jarabes, tabletas, cremas sin propiedades antimicrobianas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar el protocolo y el informe de validación del esquema de neutralización para la determinación de microorganismos específicos *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en soluciones orales, jarabes, tabletas y cremas sin propiedades antimicrobianas.
- Mostrar la aptitud del método para la determinación de microorganismos específicos *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en soluciones orales, jarabes, tabletas y cremas sin propiedades antimicrobianas.

## JUSTIFICACIÓN

La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables<sup>5</sup>. Al validar el esquema de neutralización en estas matrices, se crea evidencia documentada que garantizará un alto grado de confianza en la técnica aplicada para la determinación de microorganismos específicos en soluciones orales, jarabes, tabletas, cremas, garantizando que no se obtendrán resultados falsos negativos o falsos positivos en los productos, beneficiando a la población al garantizar que los productos son seguros.



## MATERIALES Y METODOS

**Muestras.** Las muestras utilizadas fueron antitusivos y expectorantes como jarabe, un suplemento nutricional como disolución, un anti anginoso como crema y un analgésico y antipirético como tableta.

**Equipos.** Los equipos involucrados son Autoclave All American, Modelo 75X; Incubadora Biobase Modelo BPJX-H2301; Balanza Semi analítica Mettler Toledo, Modelo ML4001; Cuenta Colonias Modelo 3327; Cabina Bioseguridad Biobase Modelo 11235BBC86

**Medios de cultivo y diluentes.** Caldo MacConkey, Agar MacConkey, Caldo Rappaport, Agar XLD, Agar cetrimide, Agar Sal Manitol, Tubos con 9.0 mL, 9.90 mL, y frascos con 99.0 mL de Solución Amortiguadora de Fosfatos a pH 7.2, Tubos con 9.0 mL, 9.90 mL, y frascos con 90.0 mL de Caldo Casoy + Tween 80 0.1%

**Cepas de trabajo.** *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Escherichia coli* ATCC 8739

**Procedimientos.** La investigación se realizó iniciando con la revisión bibliográfica, elaboración del protocolo de validación, ejecución de la prueba de aptitud del método de prueba, ejecución de la validación del esquema de neutralización, procesamiento de datos, elaboración de informe de validación.

## PARÁMETROS A ESTUDIAR Y LOS CORRESPONDIENTES CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- Prueba de aptitud del método
- Validación de recuperación microbiana en artículos farmacopeicos

## REFERENCIA DEL MÉTODO ANALÍTICO A VALIDAR

- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA NF 2021

## PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS A EVALUAR

### PRUEBAS DE APTITUD

#### PRUEBA DE APTITUD DEL MÉTODO PARA

**MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS** Realizar preparación de la muestra bajo las siguientes condiciones:

Tabla N°1 diluciones y diluentes *Escherichia coli*

<b>Diluciones</b>	10 <sup>1</sup> 10 g o mL de muestra en 90 mL Caldo Casoy + Tween 80 0.1%
	10 <sup>2</sup> 10 mL de la dilución anterior en 90 mL Dil 10 <sup>2</sup> Caldo Casoy + Tween 80 0.1% 30-35 °C/18 horas
<b>Caldos de incubación:</b>	1 mL de la dilución anterior en 100 mL Caldo MacConkey 42-44°C/24 horas
	<i>Escherichia coli</i>
<b>Microorganismo de prueba, agares de prueba y condiciones de incubación</b>	10 mL en AGAR MacConkey 30-35°C 18 horas

Tabla N°2 diluciones y diluentes *Salmonella spp*

<b>Diluciones</b>	10 <sup>1</sup> 10g o mL de muestra en 90mL Caldo Casoy + Tween 80 0.1% 30-35 °C/18 horas
<b>Caldos de incubación:</b>	0.1 mL de la dilución anterior en 10 mL Caldo Rappaport* 30-35 °C/18 horas
<b>Microorganismo de prueba, agares de prueba y condiciones de incubación</b>	<i>Salmonella spp</i>
	10 mcL en AGAR XLD 30-35°C 18 horas

Tabla N°3 diluciones y diluentes *Staphylococcus aureus*

<b>Diluciones</b>	10 <sup>1</sup> 10g o mL de muestra en 90mL
<b>Caldo de incubación:</b>	10 <sup>2</sup> 10 mL de la dilución anterior en 90 mL Caldo Casoy + Tween 80 0.1% 30-35 °C/18 horas
<b>Microorganismo de prueba, agares de prueba y condiciones de incubación</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	10 mcL en AGAR Sal Manitol 30-35°C 18 horas

Tabla N°4 diluciones y diluentes *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Diluciones</b>	10 <sup>1</sup> 10g ó mL de muestra en 90mL
<b>Caldo de incubación:</b>	10 <sup>2</sup> 10 mL de la dilución anterior en 90 mL Caldo Casoy + Tween 80 0.1% 30-35 °C/18 horas
<b>Microorganismo de prueba, agares de prueba y condiciones de incubación</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	10 mcL en AGAR Cetrímide 30-35°C 18 horas

Al momento de la mezcla se agregó cada cepa de prueba en el medio de crecimiento indicado (caldo tripticasa y soya que se incuba), usando un número de microorganismos equivalente a no más de 100UFC, la prueba se realizó bajo las condiciones descritas en las tablas N°1 - N°4

Se deben detectar los microorganismos específicos con las reacciones indicadoras descritas en las tablas anteriormente presentadas. Si para un producto determinado, la actividad antimicrobiana con respecto al microorganismo para el cual se indica no puede neutralizarse, se asume que el microorganismo inhibido no estará presente en el producto.



## VALIDACIÓN DE RECUPERACIÓN MICROBIANA EN ARTÍCULOS FARMACOPEICOS

### VALIDACIÓN DE MÉTODO DE NEUTRALIZACIÓN

Una vez realizada la prueba de aptitud de método, para los microorganismos específicos, el siguiente propósito fue comprobar que el esquema de neutralización encontrado no interfiere en la recuperación de microorganismos. Para ello, se tomó un inóculo no mayor de 100UFC que corresponde a no más del 1% del volumen total de la dilución. Este inóculo es empleado en 3 grupos de prueba diferentes para determinar la eficacia del neutralizante y la ausencia de toxicidad para los microorganismos.

GRUPO PRUEBA (A): Producto + Esquema de Neutralización + Inóculo.

GRUPO CONTROL (B): Esquema de Neutralización seleccionado + Inóculo

GRUPO VIABILIDAD (C): Inóculo  $\leq 100$  UFC en solución buffer pH 7.2 que equivale al volumen final que se está trabajando.

De cada grupo se evalúan 6 repeticiones, utilizando para cada caso el diluyente, dilución, agar y temperatura seleccionada en la prueba de aptitud del método.

### GRUPO DE PRUEBA (A): MATRIZ + ESQUEMA DE NEUTRALIZACIÓN+ INÓCULO

1. A la dilución en la que el producto se incubaba, se adicionó un inóculo estandarizado de no más de 100 UFC en donde el volumen no es mayor del 1% del volumen de la dilución final con el producto.
2. Los volúmenes para esos inóculos son:
  - Para 100 mL (Producto + dilución) se usó como máximo 1.0 mL inóculo, el cual contiene  $\leq 100$  UFC.
  - Para 10 mL (Producto + dilución) se usó 0.1 mL inóculo el cual contiene  $\leq 100$  UFC.
3. Para cada microorganismo, de la dilución en Caldo Casoy que se incubó a 30-35°C/18 horas, se realizaron 6 repeticiones, rotulando las placas de agar y transfiriendo 1.0 mL de la dilución a cada una de las 6 placas Petri, agregando la cantidad necesaria de Agar Tripticosa y Soya manteniendo la temperatura a no más de 45° C
4. Incubando las placas a una temperatura de 30° a 35°C durante un periodo de 18 horas.
5. Realizando las lecturas, recolectando los datos y comparando con la cantidad de microorganismos recuperados siguiendo el mismo procedimiento en ausencia de la muestra de prueba (grupo de prueba B).

### GRUPO B: ESQUEMA DE NEUTRALIZACIÓN + INÓCULO

Se realizaron grupos de siembra de las matrices (diluyente o caldo de cultivo con los neutralizantes) a evaluar, por lo que se llevó una sola vez el Grupo B que corresponde para cada esquema de neutralización. A continuación, se detalla el procedimiento para realizar este grupo de evaluación:

1. Se preparó un tubo con 9.0 mL de Caldo Casoy + Tween 80 0.1%
2. 0.9 mL de Agua de peptona
3. Inoculando al frasco 0.1 mL de inóculo.
4. Realizando 6 repeticiones, agregando la cantidad necesaria de Agar Tripticosa y Soya, manteniendo la temperatura a no más de 45° C
5. Incubando las placas a una temperatura de 30° a 35°C durante un periodo de 18 horas.
6. Realizando las lecturas, recolectando los datos y comparando con la cantidad de microorganismos recuperados, siguiendo el mismo procedimiento cuando la muestra está presente (grupo de prueba A).



### **GRUPO C: INÓCULO EN BUFFER pH 7.2**

Este proceso es la cuenta viable de los microorganismos de prueba, la comparación de este grupo con el grupo A permitió establecer parámetros de recuperación. Se preparó de la siguiente forma:

1. Colocando 0.1 mL de la suspensión de microorganismos en prueba que contiene  $\leq 100$  UFC en placa de Petri vacía.
2. Realizando seis repeticiones, agregando la cantidad necesaria de agar Trypticase y Soya, manteniendo la temperatura a no más de  $45^{\circ}\text{C}$
3. Incubando las placas a una temperatura de  $30^{\circ}$  a  $35^{\circ}\text{C}$  durante un período de 18 horas.
4. Realizando las lecturas y recolectando los datos.

### **ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE TRABAJO**

Se utilizaron Cepas EZ - PEC, son cepas diseñadas para proporcionar concentraciones finales de  $1.0 \times 10^5$  a  $1.0 \times 10^6$  UFC, de las cuales se realizan diluciones adecuadas para no exceder el volumen y la concentración del inóculo requerido para la validación que es no más del 1 % del volumen final con una concentración de menos de 100 UFC/mL o  $\leq 100$  UFC/0.1 mL.

### **PROCEDIMIENTO DE RECONSTITUCIÓN DE LAS CEPAS**

1. Sacar el vial con los pellets liofilizados, para que se mantenga a una temperatura ambiente durante un período de 30 minutos.
2. Cuando los pellets se equilibran, precalentar el fluido hidratante a  $35^{\circ}\text{C}$  aproximadamente 30 minutos.
3. Con una pinza estéril se transfiere 1 pellet al vial de fluido hidratante de 2.0 mL. No se retira el desecante del vial e inmediatamente se cierra y se guarda entre  $2^{\circ}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ .
4. Incubar el material hidratado a  $35^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos
5. Agitar el material hidratado en el vortex hasta conseguir una suspensión homogénea.
6. Realizar diluciones para llegar a la concentración de inóculo que se necesita (100 UFC/mL o 100 UFC/0.1 mL).
7. Ya queda lista la cepa de trabajo para ser inoculada según convenga en cada dilución

NOTA: La suspensión remanente debe ser utilizada en no más de 30 minutos.



## CRITERIOS DE ACEPTACION

Parámetro		Criterio de aceptación
Pruebas de aptitud del método		Se deben detectar los microorganismos específicos con las reacciones indicadoras según se describe para cada uno.
Validación del método de neutralización	Eficacia del neutralizante	La recuperación similar entre el grupo de prueba y el grupo B demuestra la eficacia adecuada del neutralizante
	Toxicidad del neutralizante	La recuperación similar entre el grupo B y el grupo de viabilidad demuestra la ausencia de toxicidad del neutralizante.

## RESULTADOS

Se muestra un resumen de los resultados estadísticos luego de la realización de la prueba preparatoria y la validación del esquema de neutralización que forman parte del informe de validación.

### 1. PRUEBA DE APTITUD DEL MÉTODO DE PRUEBA PARA TODAS LAS MATRICES

Tabla 5. Resultados prueba aptitud del método.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	MEDIOS DE CULTIVO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Staphylococcus aureus	Caldo Digerido de caseína y soja + tween 80 0.1%	Turbidez	Turbidez
	Agar Sal manitol	Colonias circulares color amarillo con halo transparente	Detectado
Escherichia coli	Caldo digerido de caseína y soja + tween 80 0.1%	Turbidez	turbidez
	Caldo MacConkey	Turbidez	turbidez
	Agar MacConkey	Colonias de color de rosa a rojo	Detectado/1mL o g
	Agar EMB	colonias circulares de color verde metálico	Detectado/1mL o g
Pseudomonas. aeruginosa	Caldo digerido de caseína y soja + tween 80 0.1%:	Turbidez.	turbidez.
	Agar Cetrimide	Colonias circulares de consistencia mucoides de color verde	Detectado/1mL o g
Salmonella entérica subsp. entérica serovar typhimurium	Caldo digerido de caseína y soja + tween 80 0.1%:	Turbidez.	turbidez.
	Agar XLD	colonias rojas con centros de color negro.	Detectado/1mL o g
	Agar Sulfito Bismuto	colonias circulares de color café metálicos	Detectado/1mL o g



## 2. VALIDACION DEL ESQUEMA DE NEUTRALIZACION

Tabla 6 resultados Validación esquema de neutralización para matriz jarabe.

MATRIZ JARABE DEXTROMETORFAN	CRITERIO DE ACEPTACION F calculado es menor F tablas. F tab= 3.68
<i>Escherichia coli</i>	F cal=0.301
<i>Salmonella entérica subsp. entérica serovar typhimurium</i>	F cal=1.595
<i>Staphylococcus aureus</i>	F cal=0.471
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F cal=0.723

El método en la dilución -1 y -2 demostró ser apto para el fin propuesto al obtener resultados de F calculado por debajo de la F de tablas.

Tabla 7 resultados Validación esquema de neutralización para matriz solución

MATRIZ SOLUCIÓN CLORURO DE MAGNESIO	CRITERIO DE ACEPTACION F calculado es menor F tablas. F tab= 3.68
<i>Escherichia coli</i>	F cal=0.074
<i>Salmonella entérica subsp. entérica serovar typhimurium</i>	F cal=1.948
<i>Staphylococcus aureus</i>	F cal=1.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F cal=0.752

El método en la dilución -1 y -2 demostró ser apto para el fin propuesto al obtener resultados de F calculado por debajo de la F de tablas



Tabla 8 resultados Validación esquema de neutralización para matriz crema

<b>CREMA DINITRATO DE ISOSORBIDA</b>	<b>CRITERIO DE ACEPTACION</b> F calculado es menor F tablas. F tab= 3.68
<i>Escherichia coli</i>	F cal=0.923
<i>Salmonella entérica subsp. entérica serovar typhimurium</i>	F cal=0.131
<i>Staphylococcus aureus</i>	F cal=1.100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F cal=0.369

El método en la dilución -1 y -2 demostró ser apto para el fin propuesto al obtener resultados de F calculado por debajo de la F de tablas

Tabla 9 resultados Validación esquema de neutralización para matriz tableta

<b>TABLETAS ACETAMINOFEN</b>	<b>CRITERIO DE ACEPTACION</b> F calculado es menor F tablas. F tab= 3.68
<i>Escherichia coli</i>	F cal= 0.118
<i>Salmonella entérica subsp. entérica serovar typhimurium</i>	F cal=0.316
<i>Staphylococcus aureus</i>	F cal=1.925
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F cal=0.4222

El método en la dilución -1 y -2 demostró ser apto para el fin propuesto al obtener resultados de F calculado por debajo de la F de tablas



## CONCLUSIÓN

Las pruebas de aptitud del método de prueba mostraron buena recuperación en todos los medios indicados para los microorganismos, se concluye luego de la validación del esquema de neutralización que, el esquema seleccionado, caldo digerido de caseína y soja + Tween 80 0.1% logra una buena neutralización y no es tóxico para los microorganismos de prueba, ya que no existe diferencia significativa entre los grupos A, B y C. Por lo tanto, el método es apropiado y apto para el fin propuesto.

## RECOMENDACIÓN

Se propone evaluar en otras matrices de soluciones orales, jarabes, tabletas y cremas, la aptitud del método, para evaluar el desempeño de este esquema de neutralización en diferentes matrices a las ejecutadas en esta investigación.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Red PARF Documento Técnico N° 11, Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica, Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica, Washington, DC enero de 2020
2. Antonio Martí Veciana; CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO, NTP 547: Evaluación de riesgos por agentes químicos. El método analítico: aspectos básicos, (2000), disponible en: [https://www.insst.es › documents › ntp\\_547.pdf](https://www.insst.es › documents › ntp_547.pdf)
3. Guidelines for drinking-water quality, 4th ed., incorporating the first addendum [Internet]. World Health Organization. [Citado el 5 de julio 2021]. Disponible en: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_7.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_7.pdf)
4. Farmacopea de los Estados Unidos de América USP Formulario Nacional, NF 2021 párrafos <62> y <1227>
5. Alicia Maroto Sánchez, Universidad Rovira I Virgili, Incertidumbre en métodos Analíticos de Rutina, Tarragona, 2002.