


Laboratorios Bonin 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 1 de 18

## 1. PROPÓSITO

Estimar el número de microorganismos aeróbicos viables presentes en artículos farmacéuticos de todo tipo, desde materias primas hasta producto terminado y determinar si los mismos cumplen con las especificaciones establecidas. La técnica utilizada es el recuento en placa que incluye el recuento aeróbico total de microorganismos, el recuento de mohos y levaduras y la determinación de la ausencia de patógenos específicos entre los que se encuentran *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., y *Candida albicans*.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento aplica sobre los siguientes productos: sueros orales, sueros parenterales, líquidos orales, semisólidos, sólidos y materias primas que requieren análisis microbiológico según la Farmacopea de los Estados Unidos de América.

## 3. DOCUMENTOS RELACIONADOS

CÓDIGO	NOMBRE DEL DOCUMENTO
A-AC-002	Materias primas que requieren análisis microbiológico

## 4. DEFINICIONES

**Método en Placa:** consiste en colocar 1 ml de la muestra en la caja de Petri y verter sobre ella el medio de cultivo apropiado, pero la muestra analizada primero es preparada mediante una dilución 1:10, en un caldo de cultivo que contiene una sustancia neutralizante de los inhibidores o agentes antimicrobianos que pudiesen estar presentes en la muestra analizada.

**Recuento Total de Microorganismos Aerobios:** Conteo de microorganismos que utilizan oxígeno para poder vivir. Su incubación es de 48 a 72 horas a 37°C.

**Recuento de Mohos y Levaduras:** Conteo de microorganismos que pueden crecer en concentraciones altas de azúcar (4% de dextrosa). Su incubación es de 5 a 7 días a una temperatura de 20 a 25°C.

## 5. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

### RESPONSABILIDAD


**Auxiliares de Microbiología:** Son los responsables de llevar a cabo lo descrito en éste procedimiento.

**Jefe de Microbiología:** Tiene la responsabilidad de velar por el cumplimiento de éste procedimiento.

### AUTORIDAD

**Jefe de Microbiología:** Tiene la autoridad de realizar cualquier cambio requerido en éste procedimiento.

Elaborado por: Jefe de Microbiología	Firma:	Fecha: 30/09/2022
Revisado por: Asistente de Documentación	Firma:	Fecha: 30/09/2022
Aprobado por: Gerente de Negocio	Firma:	Fecha: 30/09/2022

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 2 de 18

## 6. CONTENIDO

### 6.1 Materiales

- 6.1.1 Frascos con 90 ml y 80 ml de caldo cloruro sódico peptona tamponado más 4% de polisorbato 20 (Tween 20), estériles.
- 6.1.2 Frascos con 99 ml de caldo cloruro sódico peptona tamponado más 4% de polisorbato 20 (Tween 20), estériles.
- 6.1.3 Frascos con 100 ml de caldo tripticasa soya (caldo CASO) estériles.
- 6.1.4 Frascos con 100 ml de caldo Sabouraud dextrosa 2% estériles.
- 6.1.5 Frascos con 100 ml de caldo MacConkey estériles
- 6.1.6 Frascos con 10 ml de Tween 20 estériles
- 6.1.7 Tubos con 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis para enriquecimiento de *Salmonella*
- 6.1.8 Cajas de Petri desechables estériles
- 6.1.9 Agar tripticasa soya (agar CASO) estéril a 45° C
- 6.1.10 Agar Sabouraud 4% dextrosa estéril a 45° C
- 6.1.11 Cajas de los siguientes agares: PCA, Manitol-sal, XLD, MacConkey, Cetrimida y Sabouraud 4% dextrosa
- 6.1.12 Pipetas serológicas estériles de 1, 5 y 25 ml
- 6.1.13 Jeringas de 5 y 10 ml.
- 6.1.14 Pipeteador
- 6.1.15 Espátulas estériles
- 6.1.16 Alcohol al 70% filtrado
- 6.1.17 Equipo de protección personal (cofia, mascarilla, guantes)
- 6.1.18 Marcador permanente


### 6.2 Equipo

- 6.2.1 Balanza semianalítica
- 6.2.2 Incubadora
- 6.2.3 Microondas
- 6.2.4 Mechero de gas
- 6.2.5 Marcador permanente

### 6.3 Muestras

#### 6.3.1 Muestras de producto en proceso

- 6.3.1.1 Área de inyectables (método de recuento en placa): La muestra es enviada desde producción en un recipiente estéril, inmediatamente después de terminar la preparación del producto, conjuntamente con la muestra para cuantificación de principios activos que se analiza en el Laboratorio Fisicoquímico. La cantidad mínima de muestra para su análisis es de 10 ml.
- 6.3.1.2 Área de sueros (método de filtración): Se realiza a producto envasado sin esterilizar; se analiza una botella por lote producido. Las muestras son proporcionadas por los Inspectores de Aseguramiento de calidad. Ver nota después de numeral 6.5.16.

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 3 de 18

### 6.3.2 Muestras de producto terminado

Las muestras de producto terminado para la prueba de recuento microbiano, serán proporcionadas por los inspectores de las áreas de producción, quienes durante el llenado de un producto toman muestras. Para el análisis se requiere como mínimo 30g o 30 ml muestra.

### 6.3.3 Muestras de materia prima

Las muestras de materia prima son muestreadas por el Inspector de material de empaque y materia prima según las cantidades indicadas en el **A-AC-002 Materias primas que requieren análisis microbiológico**. Estas muestras serán anotadas en el **FO-AC-170 Control de análisis microbiológico** por el **Inspector de aseguramiento de calidad** y en el **FO-CC-105 Registro de análisis de materia prima** por el **Jefe o Auxiliar de Microbiología**.

Para el análisis de cualquier tipo de muestra debe considerarse lo siguiente:

- Las muestras líquidas que constituyen verdaderas soluciones o suspensiones en agua o vehículos hidroalcohólicos (con menos de 30% de alcohol) y sólidos de disolución fácil, casi total, se diluyen directamente en un frasco con 90 ml de caldo cloruro sódico peptona tamponado más 4% de polisorbato 20 (Tween 20).
- Las muestras de ungüentos, cremas, óvulos, supositorios y líquidos inmiscibles en agua necesitan ser mezcladas con Tween 20 y disolverlas; para disolverlas colocar en un frasco con 10 ml de Tween 20 en la incubadora a 37° C por treinta minutos.

## 6.4 Registro de las muestras

**6.4.1** Las muestras de producto en proceso serán anotadas en el **FO-CC-103 Registro de análisis de recuento microbiano de producto en proceso / terminado** por el **Jefe o Auxiliar de Microbiología**.


**6.4.2** Las muestras de producto terminado serán anotadas en el **FO-AC-170 Control de Análisis Microbiológico** por el **Inspector de aseguramiento de calidad** y en el **FO-CC-103 Registro de análisis de recuento microbiano de producto en proceso / terminado** por el **Jefe o Auxiliar de Microbiología**.

**6.4.3** Las muestras de materia prima serán anotadas en el **FO-CC-105 Registro de análisis de materia prima** por el **Jefe o Auxiliar de Microbiología**.


**6.4.4** Además de la información de las muestras debe incluirse en el registro correspondiente los números de lote de los medios de cultivo y diluyentes utilizados en los análisis del día en los espacios correspondientes de los registros.

## 6.5 Recuento aeróbico total

**6.5.1** La prueba de recuento microbiano se realiza en el Área de siembra del Laboratorio de Microbiología. Para ingresar a ésta, colocarse cofia, mascarilla y cambiarse calzado.

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 4 de 18

- 6.5.2** Trasladar las muestras a analizar, medios de cultivo y todo el material necesario.
- 6.5.3** Ingresar a la sala 701 Vestidor Área Estéril; retirarse la vestimenta de uso en área externa del laboratorio y colocarse traje blanco. Ingresar a la sala 702 Prueba Esterilidad y activar sistema de aire de la siguiente manera: oprimir el botón derecho del control derecho “cool” y con el botón izquierdo “on.”
- 6.5.4** Llevar los materiales hacia la sala 703 Muestras no estériles y descargarla.
- 6.5.5** Colocarse mascarilla y guantes para dar inicio a la prueba.
- 6.5.6** Encender el mechero de gas
- 6.5.7** En el caso de producto terminado líquido, desinfectar el exterior de los envases con alcohol al 70% filtrado y agitarlos vigorosamente; preparar una mezcla (100ml) de la totalidad de las muestras (pool de muestras). Preparar una dilución 1:10 de la mezcla de las muestras, transfiriendo con pipeta estéril o jeringa desechable 10 ml de la mezcla de producto a un frasco con 90ml de caldo cloruro sódico peptona tamponado más 4% de polisorbato 20 (Tween 20).
- 6.5.8** Para las muestras de comprimidos como producto terminado: preparar una dilución 1:10 colocando 10 gramos de tabletas en un frasco con 90ml de caldo cloruro sódico peptona tamponado más 4% de polisorbato 20 (Tween 20). Agitar para que se disuelvan. Algunos comprimidos requieren más tiempo para disolverse; dejar reposar y volver agitar hasta conseguir la disolución completa.
- 6.5.9** Agitar la dilución y dejar reposar por 20-30 min. antes de proceder al plaqueo.
- 6.5.10** Para las muestras de óvulos y supositorios pesar 10g de producto en un frasco con 10 ml de Tween 20 estéril y colocar en incubadora para que se disuelvan. Ya disueltos, mezclar con 80ml de caldo cloruro sódico peptona tamponado más 4% de polisorbato 20.
- 6.5.11** En el caso de materias primas, realizar una dilución 1:10 pesando con espátula estéril y balanza semianalítica (colocada cerca del mechero) 10 g ó 10 ml de la materia prima en 90 ml de caldo cloruro sódico peptona tamponado más 4% de polisorbato 20. En el caso de muestras de materia prima viscosas que no se puedan pipetear fácilmente, o bien que tiendan a solidificarse, realizar una dilución 1:100 con un frasco que contenga 99 ml de éste caldo.
- 6.5.12** El producto en proceso del área de inyectables no se diluye, el plaqueo se realiza directamente de la muestra recibida (1 ml en duplicado).

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 5 de 18

**6.5.13** Transcurrido el tiempo de reposo de las diluciones, mezclar y transferir 1 ml con pipeta serológica estéril a dos cajas de Petri desechables previamente rotuladas con el nombre del producto o materia prima, número de lote, medio utilizado y fecha de análisis.

**6.5.14** Agregar a las cajas 15-20ml de agar CASO previamente fundido en microondas y enfriado aproximadamente a 45°C, y mezclar en forma circular para homogenizar.

**6.5.15** Preparar un control de esterilidad (o control negativo) del agar CASO, identificando una caja con el número de lote del medio y fecha del análisis y vertiendo 15-20 ml del mismo.

**6.5.16** Incubar las cajas a una temperatura de 30-35°C por 48 horas.

**NOTA:** el producto en proceso del área de sueros se trabaja por filtración de 100 ml de producto sin esterilizar. La membrana del producto filtrado se coloca en una caja de agar PCA y se incuba de 30-35°C por 48 horas. Para éste análisis no existe límite de aceptación, solamente es parte de un monitoreo de carga microbiológica en el proceso.

## **6.6 Recuento de mohos y levaduras**

**6.6.1** Rotular 2 cajas de Petri con el nombre del producto o muestra, número de lote, medio utilizado y fecha de análisis.

**6.6.2** Transferir 1ml de la dilución 1:10 preparada para el recuento aeróbico total con pipeta estéril a cada caja de Petri.


**6.6.3** Agregar a las cajas 15-20 ml de agar Sabouraud 4% dextrosa previamente fundido en microondas y enfriado aproximadamente a 45°C; mezclar en forma circular para homogenizar.

**6.6.4** Preparar un control de esterilidad (o control negativo) del agar Sabouraud 4% dextrosa, identificando una caja con el número de lote del medio y fecha del análisis y vertiendo 15-20 ml del mismo.

**6.6.5** Incubar las cajas a una temperatura de 20-25°C por 5 días como mínimo y por un máximo de 7.

## **6.7 Interpretación**

**6.7.1** Después de transcurrido el tiempo de incubación del agar CASO, las cajas deben sacarse de la incubadora y examinarse para verificar el crecimiento de microorganismos. Contar el número de colonias presentes y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por gramo o mililitro de muestra. El número de colonias promediado se multiplica por 10 (el factor de dilución utilizado), para expresar en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro o por gramo de muestra. En el caso de no recuperarse colonias de las placas expresar el resultado como menos de diez unidades

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 6 de 18

formadoras de colonia por mililitro de muestra ( $<10$  UFC/g ó  $<10$  UFC/ml). De la misma forma se realiza la determinación del recuento de mohos y levaduras.

**6.7.2** En el caso de materias primas que se han diluido 1:100 el promedio de unidades formadoras de colonia obtenido se multiplica por 100 y de no recuperarse colonias el resultado se expresa como  $<100$  UFC/mg ó  $<100$  UFC/ml.

**6.7.3** Los controles de esterilidad de los medios no deben tener crecimiento alguno.

**6.8 Investigación de patógenos específicos:** En la **Tabla 1** se indica los microorganismos a investigar según la vía de administración del producto y en el **A-AC-002 Materias primas que requieren análisis microbiológico** se indican las que requieren investigación de microorganismos específicos.

#### **6.8.1 Investigación de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa***

**6.8.1.1** Transferir 10ml de la dilución 1:10 preparada para el recuento aeróbico total (numeral 6.5) a un frasco con 100 ml de caldo CASO, mezclar e incubar a 30-35° C por 18-24 horas.

**6.8.1.2** Posteriormente debe trasladarse una asada del caldo a una caja de agar Manitol-sal para determinar la presencia de *S. aureus* y una a agar Cetrimida para determinar la presencia de *P. aeruginosa*. Incubar éstas cajas a 30-35° C por 18-72 horas.

**6.8.1.3** En el caso de jarabes, gotas y otras soluciones claras, el crecimiento es detectable mediante la ausencia o presencia de turbidez. En el caso de suspensiones, debido a su naturaleza opaca o turbia, la presencia de crecimiento solo es verificable mediante el traspaso a los medios selectivos mencionados anteriormente.

**6.8.1.4** Transcurrido el tiempo de incubación, examinar las cajas. Las colonias de *S. aureus* se observan de color amarillo rodeadas de zonas del mismo color sobre el agar Manitol-sal. Las colonias de *P. aeruginosa* producen un pigmento verde-amarillo (piocianina) sobre el agar Cetrimida. Confirmar la identidad de *P. aeruginosa* utilizando un sistema de identificación de microorganismos si se dispone del mismo o bien enviar a análisis externo.

**6.8.1.5** Si el crecimiento que se observa no se ajusta a las descripciones anteriores, la muestra del producto cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.


#### **6.8.2 Investigación de *Escherichia coli***

**6.8.2.1** Transferir 10ml de la dilución 1:10 preparada para el recuento aeróbico total (numeral 6.5) a un frasco con 100 ml de caldo CASO, mezclar e incubar 30-35° C por 24-48 horas.

**6.8.2.2** Posteriormente, subcultivar 10 ml en un frasco con 100 ml de caldo MacConkey e incubar a una temperatura de 30-35° C durante 18-72 horas; transcurrido este tiempo de incubación, debe trasladarse una asada del caldo a una caja de agar MacConkey para determinar la presencia de *E. coli*, incubar a 30-35° C por 18-72 horas.

**6.8.2.3** En el caso de jarabes, gotas y otras soluciones claras, el crecimiento es detectable mediante la ausencia o presencia de turbidez. En el caso de suspensiones, debido a su naturaleza



<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 7 de 18

opaca o turbia, la presencia de crecimiento solo es verificable mediante el traspaso al medio selectivos mencionado anteriormente.

6.8.2.4 Transcurrido el tiempo de incubación, examinar las cajas. Las colonias de *E. coli* se observan grandes, de color rojo ladrillo, rodeadas de una zona de precipitado del mismo color. Debe confirmarse la identidad de este microorganismo utilizando un sistema de identificación de microorganismos si se dispone del mismo o bien enviar a análisis externo.

6.8.2.5 Si el crecimiento que se observa no se ajusta a la descripción anterior, la muestra del producto cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*.

### 6.8.3 Investigación de *Candida albicans* (para óvulos)

6.8.3.1 Transferir 10ml de la dilución 1:10 preparada para el recuento aeróbico total (numeral 6.5) a un frasco con 100 ml de caldo Sabouraud dextrosa, mezclar e incubar 30-35° C por 3-5 días.

6.8.3.2 Transcurrido este tiempo de incubación, trasladar una asada del caldo a una caja de agar Sabouraud dextrosa para determinar la presencia de *C. albicans*, incubar a 30-35° C por 24-48 horas.

6.8.3.3 Examinar las cajas las colonias de *C. albicans* se observan de color blanco de aspecto cremoso. Confirmar la presencia de levaduras con una tinción de Gram, u observación de una preparación en fresco con solución salina. Debe confirmarse la identidad de este microorganismo utilizando un sistema de identificación de microorganismos si se dispone del mismo o bien enviar a análisis externo.

### 6.8.4 Investigación de *Salmonella* sp. (para las materias primas que lo requieran)

6.8.4.1 Transferir 10ml de la dilución 1:10 preparada para el recuento aeróbico total (numeral 6.5) a un frasco con 100 ml de caldo CASO.

6.8.4.2 Incubar a 30-35°C por 24-48 horas; posteriormente, subcultivar 0.1 ml en un tubo con 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis para enriquecimiento de *Salmonella* e incubar a una temperatura de 30-35° C durante un período de 18 a 24 horas; transcurrido este tiempo de incubación, debe trasladarse una asada del caldo a una caja de agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato) e incubar a 30-35° C por 18-48 horas.


6.8.4.3 El crecimiento de colonias bien desarrolladas de color rojo con o sin centros negros indica la posible presencia de *Salmonella*. Debe confirmarse la identidad de este microorganismo utilizando un sistema de identificación de microorganismos si se dispone del mismo o bien enviar a análisis externo.

6.8.4.4 La materia prima cumple con la prueba si no se desarrollan colonias con estas características.

### 6.9 Límites de aceptación

6.9.1 El límite de aceptación para producto en proceso es de 5 UFC/ml de producto.

6.9.2 Los límites de aceptación para el producto terminado se encuentran en la **Tabla 1**.

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 8 de 18

6.9.3 Los límites de aceptación para las materias primas utilizadas para la manufactura de productos naturales y para productos naturales como producto terminado, se encuentran en la **Tabla 2**.

6.9.4 Los límites de aceptación para las materias primas que llevan análisis microbiológico se encuentran en el **A-AC-002 Materias primas que requieren análisis microbiológico**.

Si el resultado de una muestra analizada sobrepasa el límite aceptable máximo, se procede a realizar la repetición del análisis, solicitando al **Inspector** de aseguramiento de calidad correspondiente una muestra/ nueva/s ampliada en cantidad al doble de la muestra inicial. Si el resultado del segundo muestreo nuevamente sobrepasa el límite aceptable máximo, se procede al rechazo del producto/ materia prima.

### 6.10 Reporte de resultados

Los resultados del análisis se reportan al cumplirse 7 días de incubación de las muestras (el tiempo máximo de la incubación para el recuento de mohos y levaduras). Los resultados del análisis de producto en proceso y producto terminado se reportan en el **FO-AC-198 Reporte de Análisis Microbiológico** para que el mismo sea adjuntado a la papelería del producto o materia prima. Los resultados del análisis de las materias primas se reportan en el **FO-AC-198 Reporte de Análisis Microbiológico** y se entregan al **Analista de materia prima** quien lo adjuntará a **R03.I01.PO.06 Hoja de análisis de materia prima/Material de empaque y envase**. Además, los resultados deben registrarse en el **FO-CC-103 Registro de análisis de recuento microbiano de producto en proceso / terminado** y en el **FO-AC-105 Registro de análisis de materia prima**.

## 7. REVISIÓN DE ESTE DOCUMENTO

El presente documento debe revisarse antes del 30/09/2024 o antes de su vencimiento si fuere necesario.


## 8. BIBLIOGRAFÍA

Farmacopea de los Estados Unidos de América 2012 (USP 40). <61> Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de recuento microbiano; <62> Examen microbiológico de productos no estériles: Prueba de microorganismos específicos; <111> Examen microbiológico de productos no estériles: criterios de aceptación para preparaciones farmacéuticas y sustancias de uso farmacéutico.

## 9. ARCHIVO

El presente documento original será archivado en Gestión de Calidad bajo condiciones de seguridad adecuadas, además, se emiten 1 copias controlada para el área del Laboratorio Microbiológico siendo la persona responsable Jefe de Microbiología



<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 9 de 18


## 10. ANEXOS

CÓDIGO	NOMBRE
N.A.	

**Tabla 1 -** Criterios de aceptación para la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles (producto terminado)

Vía de administración	Recuento aeróbico total (UFC/g ó UFC/ml)	Recuento de mohos y levaduras (UFC/g ó UFC/ml)	Microorganismos específicos
Preparaciones no acuosas para uso oral	2000	200	Ausencia de Escherichia coli (1 g ó 1 ml)
Preparaciones acuosas para uso oral	200	20	Ausencia de Escherichia coli (1 g ó 1 ml)
Uso rectal	2000	200	-----
Uso oromucosal	200	20	Ausencia de Staphylococcus aureus (1g ó 1 ml) Ausencia de Pseudomonas aeruginosa (1g ó 1 ml)
Uso gingival	200	20	Ausencia de Staphylococcus aureus (1g ó 1 ml) Ausencia de Pseudomonas aeruginosa (1g ó 1 ml)
Uso cutáneo	200	20	Ausencia de Staphylococcus aureus (1g ó 1 ml) Ausencia de Pseudomonas aeruginosa (1g ó 1 ml)
Uso nasal	200	20	Ausencia de Staphylococcus aureus (1g ó 1 ml) Ausencia de Pseudomonas aeruginosa (1g ó 1 ml)
Uso auricular	200	20	Ausencia de Staphylococcus aureus (1g ó 1 ml) Ausencia de Pseudomonas aeruginosa (1g ó 1 ml)
Uso vaginal	200	20	Ausencia de Staphylococcus aureus (1g ó 1 ml) Ausencia de Pseudomonas aeruginosa (1g ó 1 ml) Ausencia de Candida albicans (1g ó 1 ml)
Uso por inhalación	200	20	Ausencia de Staphylococcus aureus (1g ó 1 ml) Ausencia de Pseudomonas aeruginosa (1g ó 1 ml) Ausencia de bacterias Gramnegativas tolerantes a la bilis (1g ó 1 ml)


Referencia: <1111> Examen microbiológico de productos no estériles: Criterios de aceptación para preparaciones farmacéuticas y sustancias de uso farmacéutico. USP 40.

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 10 de 18

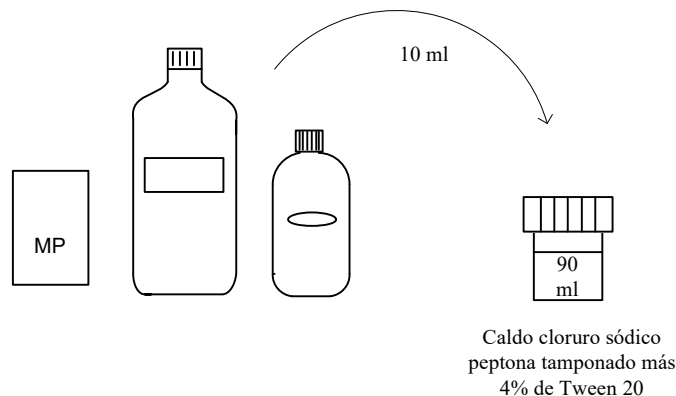
**Tabla 2** - Especificaciones para determinación de recuento microbiano en productos naturales\*

	<b>Uso</b>	<b>Recuento aeróbico total UFC/g</b>	<b>Recuento de mohos y levaduras UFC/g</b>	<b>Patógenos</b>
Producto terminado	Para uso oral	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausencia de <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella sp.</i>
	Para uso tópico	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausencia de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>

\*Referencia: Reglamento técnico centroamericano. Productos farmacéuticos. Productos naturales medicinales para uso humano. Verificación de la calidad. RTCA11.03.56:09.

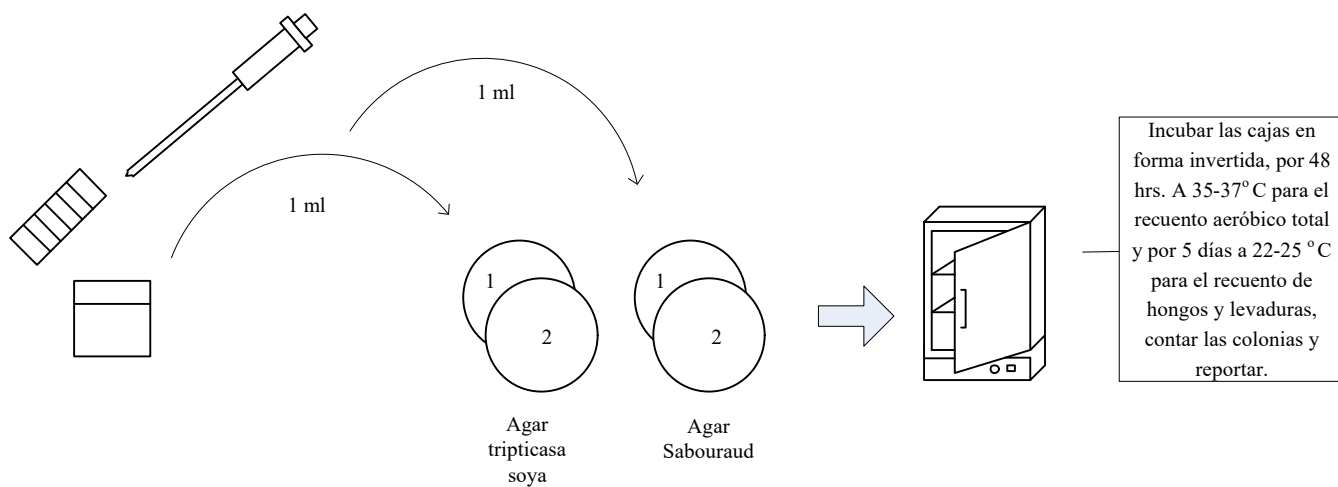
<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 11 de 18

**Diagrama 1** - Prueba de límite microbiano en producto terminado y materia prima




Preparar una dilución 1:10 del producto a analizar colocando 10 ml en 90 ml de caldo Cloruro sódico peptona tamponado. Agitar vigorosamente y dejar reposar de 20-30 min.

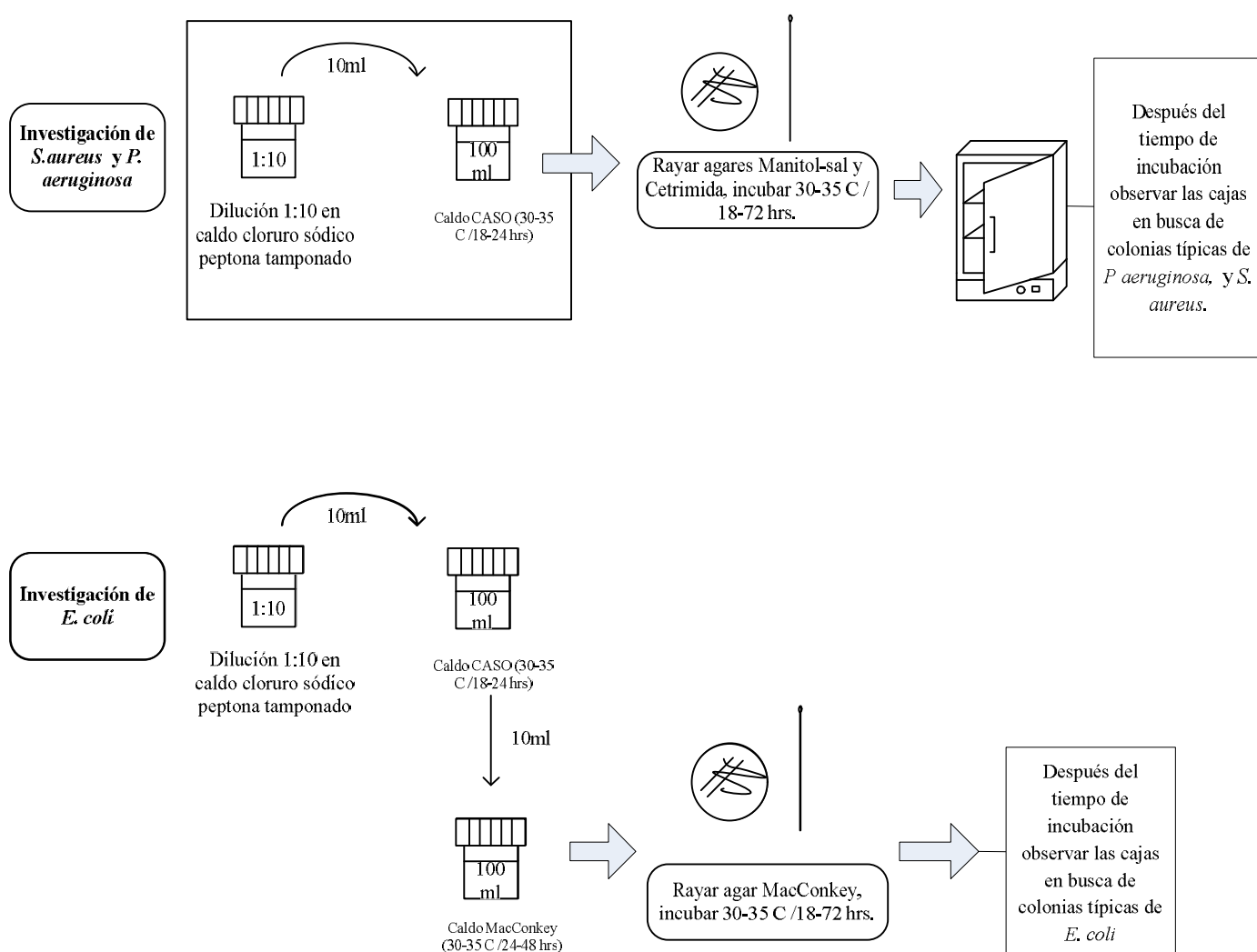
- Recuento en placa (total y de mohos y levaduras)




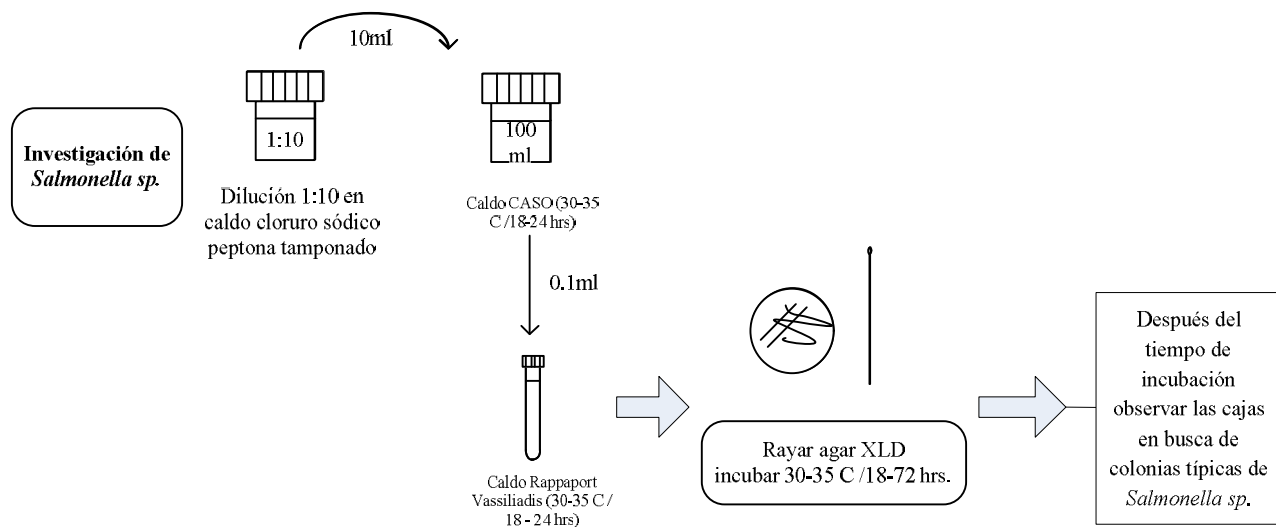
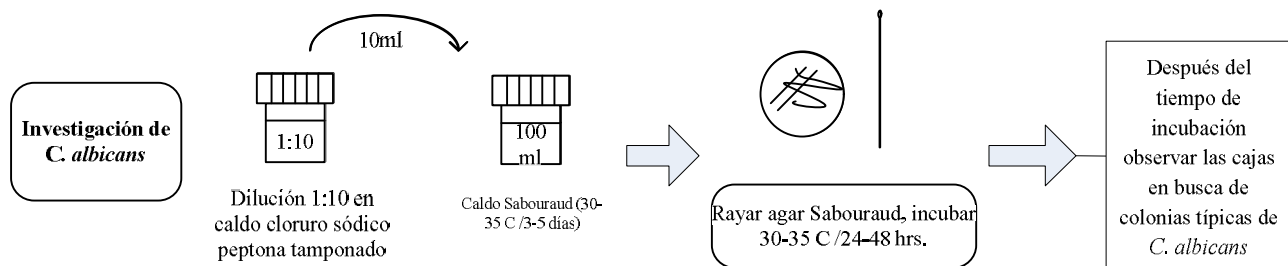
Verter 1 ml de la dilución en 4 cajas (2 para agar Sabouraud y 2 para agar tripticasa soya), verter los agares fundidos estériles a 45° C, agitar en forma circular, dejar solidificar.


<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>		<b>Código:</b>
	<b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>		<b>PEO-AC-082-13</b>
	<b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>		<b>Versión: 13</b>
			Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024 Página 12 de 18

**Diagrama 2** - Investigación de patógenos específicos



<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>		<b>Código:</b>
	<b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>		<b>PEO-AC-082-13</b>
	<b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>		<b>Versión: 13</b>
			Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024 Página 13 de 18

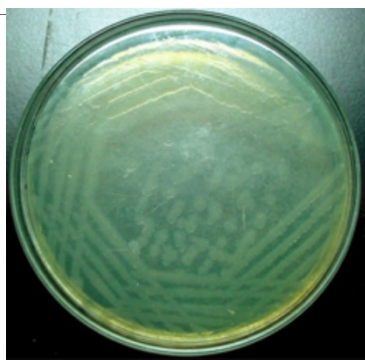


<p>Laboratorios Bonin</p> 	<p><b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b></p> <p><b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b></p> <p><b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b></p>	<p><b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b></p> <p><b>Versión: 13</b></p> <p>Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024</p> <p>Página 14 de 18</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Figuras –** Colonias típicas de patógenos en agares



*Escherichia coli*  
en agar MacConkey



*Pseudomonas aeruginosa*  
en agar Cetrimida




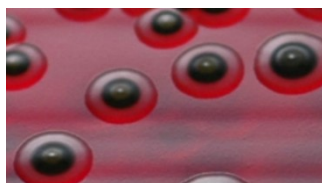
*Staphylococcus aureus*  
en agar Manitol-sal



*Candida albicans*  
en agar Sabouraud



<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 15 de 18




*Salmonella sp.*  
en agar XLD

## 11. CONTROL DE REGISTROS


CÓDIGO Y NOMBRE DEL REGISTRO	RESPONSABLE DE SU ARCHIVO	MODO DE INDIZACIÓN Y ARCHIVO	ACCESO AUTORIZADO	TIEMPO DE CONSERVACIÓN
FO-CC-103 Registro de análisis de recuento microbiano de producto en proceso / terminado	Jefe de Microbiología	Libro	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años
FO-CC-105 Registro de análisis de materia prima	Jefe de Microbiología	Libro	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años
FO-AC-170 Control de análisis microbiológico	Laboratorio de análisis químico	NA	Departamento de Aseguramiento de calidad	NA
FO-AC-198 Reporte de Análisis Microbiológico	Secretaría de Aseguramiento de Calidad	Adjunto a hoja técnica	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años

## 12. CAMBIOS EN EL DOCUMENTO


Versión	Descripción del cambio
1	Es la versión basada en la Farmacopea de los Estados Unidos de América 2008 (USP 31), por lo que el código y el nombre de esta referencia fue cambiado a lo largo del texto de este método de análisis. Esta versión incluye además los siguientes cambios:

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 16 de 18

	<p>Cambio del nombre del método de análisis, anteriormente era MA.MB.10 Prueba de límite microbiano, USP 28. Método en placa.</p> <p>Se cambió el término cabina de bioseguridad por campana de flujo laminar.</p> <p>Se cambió el nombre del departamento de Control de Calidad por el de Aseguramiento de Calidad.</p> <p>Se cambió la estructura general del método de análisis: se detalla en numerales separados el procedimiento para el recuento aeróbico total y el recuento de mohos y levaduras (6.2 y 6.3) y se incluye el procedimiento para la investigación de los patógenos específicos E. coli, P. aeruginosa y S. aureus, según lo indica la USP 31 capítulo &lt;61&gt;.</p> <p>El tiempo de incubación para el recuento de mohos y levaduras se cambió de 7 días a 5 días, según el rango establecido por la USP 31.</p> <p>Se incluyó el procedimiento para efectuar el recuento aeróbico total y recuento de mohos y levaduras de materias primas de origen vegetal y de fitofármacos como producto terminado.</p> <p>Para el numeral 6.6 Límites de aceptación se incluyó una nueva tabla de límites para producto terminado que incluye límites aceptables y límites máximos aceptables (según la USP 31 capítulo general &lt;1111&gt;) en el numeral 9. Anexos (Tabla No. 1 Criterios de aceptación para la calidad microbiológica formas farmacéuticas no estériles) y la Tabla No. 2 Límites de aceptación de materias primas vegetales y fitofármacos como producto terminado.</p> <p>Se eliminó el numeral 6.5 Repetición de la prueba; la información sobre el procedimiento a seguir en caso de resultados dudosos o fuera de especificaciones se incluyó en el inciso 6.6 Límites de aceptación.</p> <p>Se eliminó el numeral 6.6 Control de calidad interno, que hablaba sobre los controles de esterilidad de los agares Caso y Sabouraud 4% dextrosa que deben colocarse en cada análisis de muestras; esta información se incluyó en los numerales 6.2 Recuento aeróbico total y 6.3 Recuento de mohos y levaduras.</p> <p>En 9. Anexos, se incluyó un diagrama para graficar el procedimiento de la prueba de límite microbiano.</p>
2	<p>En el inciso 1: Propósito y alcance se agregó <i>Salmonella sp.</i> como patógeno específico a investigar.</p> <p>En el inciso 5. Material y equipo a utilizar se agregó el agar XLD y el Tetratiónato-bilis verde brillante.</p> <p>Se cambió el nombre del registro correspondiente en el inciso 6.1.1 Muestras de producto terminado, en el inciso 7. Control y registros del sistema y el inciso 6.7 Reporte de resultados, de R01.MA.MB.01 Libro de registro de esterilidades por el de R01.MA.MB.10 Libro de registro de análisis de Límites microbianos y Materia prima.</p> <p>Se eliminaron dos incisos del numeral 6.2 Recuento aeróbico total y uno del numeral 6.3 Recuento de mohos y levaduras referentes a diluciones a realizar a fitofármacos.</p> <p>Se cambió el nombre del medio de cultivo caldo Lactosado por el de caldo Lactosa.</p> <p>Se cambió la Tabla No.1 Criterios de aceptación para la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles y la Tabla No. 2 Límites de aceptación de materias primas vegetales y fitofármacos como producto terminado.</p>

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 17 de 18

3	Se cambió el título del procedimiento, el anterior era: PRUEBA DE LÍMITE MICROBIANO USP 31 <61>. En el inciso 1. Propósito y alcance se agregó <i>Candida albicans</i> como patógeno específico a investigar. Esta versión cambia al nuevo formato y su contenido se adecúa a la nueva instalación del Laboratorio de Análisis Microbiológico, en la nueva planta de producción de Laboratorios Bonin.
4	Se eliminó la Campana de flujo laminar de los materiales y equipo a utilizar. Se agregó el inciso 6.4.3 Investigación de Salmonella sp. para las materias primas que lo requieran. Debido a esto en el inciso 5. Materiales se agregaron tubos con 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis. Este inciso corresponde a lo descrito en la USP 35. Esto también se incluyó en el diagrama 1 el cual se seccionó en dos partes. Se modificó la Tabla 1 - Criterios de aceptación para la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles; se eliminaron las columnas de límite interno de rutina. Se eliminó el PR-CC-13 Procedimiento para el muestreo de materia prima vegetal de la sección Documentos relacionados.
5	Se eliminó la palabra Libro de los registros
6	En el numeral 5.6.1 Investigación de Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa inciso f) se indica utilizar un API 20 NE para confirmar la identidad de P. aeruginosa. En el numeral 5.6.2 Investigación de Escherichia coli inciso e) se indica utilizar un API 20E para confirmar la identidad de éste microorganismo. En el numeral 5.6.3 Investigación de Salmonella sp., se elimina la utilización del caldo Rappaport Vassiliadis para la investigación de Salmonella sp. y en el inciso d) de este numeral se indica utilizar un API 20 E para confirmar la identidad de éste microorganismo.
7	Se cambia el nombre y el código y el formato del documento según lo indicado en el PEO-SGC-001-11 Elaboración, Aprobación, Revisión y Control de documentos, con ello cambia la numeración de la versión anterior. Se cambia el código del registro de las muestras a lo largo del texto del documento, actualmente es el FO-CC-103 registro de análisis de recuento microbiano en producto en proceso/terminado. Se cambia la ubicación en el Laboratorio para realizar la prueba descrita en éste procedimiento (se traslada al Área de siembra, sala 703 – Muestras no estériles). En el numeral 6.5 Recuento aeróbico total se describe la forma de ingresar las muestras e insumos necesarios, así como la indumentaria a utilizar. En el numeral 6.3 Muestras se incluye el producto en proceso del área de sueros. Se incluye una nota en el numeral 6.5 referente a éstas muestras. Se incluye el numeral 6.4 Registro de las muestras en donde se especifica los códigos de los registros en donde se anotan las diferentes muestras y se indica que deben registrarse los números de lote de los medios de cultivo utilizados en los análisis.
8	Se modifica el método de análisis según la armonización de las farmacopeas (USP, Europea, Japonesa) cambiando los medios de cultivo y el procedimiento: el caldo peptona de caseína-lecitina-polisorbato se sustituye por caldo cloruro sódico peptona tamponado, y se introducen los caldos MacConkey (que sustituye al caldo lactosa) y el caldo Sabouraud. Las modificaciones se realizaron en el numeral 6.1 Materiales; 6.5 Recuento aeróbico total, 6.8 Investigación de patógenos específicos (6.8.1, 6.8.2, 6.8.3 y 6.8.4).

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE RECuento MICROBIANO Y DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS</b>  <b>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-082-13</b>
		<b>Versión: 13</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 18 de 18

	Se modifica la Tabla 1 en cuanto a su forma y el diagrama 1 y Diagrama 2 de acuerdo a los cambios de los numerales mencionados. Se agregan figuras en la sección de anexos.
9	Se agrega en el alcance del procedimiento el análisis de productos sólidos comprimidos) se agrega un numerales al numeral 6.5 Recuento aeróbico total que detallan el análisis de este tipo de producto.
10	En el numeral 6.9.4 se amplía la forma de proceder en caso una muestra de materia prima o producto terminado salga de las especificaciones establecidas. En el numeral 6.3.3 inciso b) se cambia el volumen del frasco de Tween 20 de 20 ml a 10 ml. En el numeral 6.5 (6.5.2 y 6.5.4) se elimina el uso de la carretilla para el traslado de los materiales. En los numerales 6.8.1, 6.8.2, y 6.8.4 se cambia el nombre API20E por el de Sistema de identificación de microorganismos. En la tabla 1 se corrige la especificación de microorganismos específicos para medicamentos de vía de administración rectal, se eliminan S. aureus y P. aeruginosa. En 11Control de registros se cambia el código FO.MB.01 Control de análisis microbiológico por FO-AC-198.
11	Se cambia el tipo de formato en el punto 6.3.3. y el punto 11 Controles de registro por “FO-AC-170 Control de análisis microbiológico “Se corrige texto en el inciso 6.8.1.2. Se corrige numeral de formato en el inciso 6.10. por “FO-AC-198”.
12	Se elimina el numeral 6.1.9 de materiales correspondiente a bolsas estériles En el numeral 6.3.2 se elimina texto con respecto al muestreo. En los numerales 6.5.13 y 6.6.2 se amplía al uso de jeringa descartable. En los numerales 6.8.1.4, 6.8.2.4 y 6.8.4.3 se agrega la posibilidad del análisis externo de las muestras si no se dispone del sistema de identificación. Se elimina la nota después del numeral 6.8.2.5 (NOTA: Si se detectaran colonias sospechosas cuyas características se ajustan a las descripciones anteriores, debe confirmarse su presencia repitiendo la prueba de enriquecimiento con nuevas muestras (solicitadas al inspector de aseguramiento de calidad) debe llevarse a cabo una prueba de API para confirmar su identidad). Se agrega texto en el numeral 6.8.3.3 con respecto a la identificación de C.albicans En el numeral 6.10 se especifica el reporte de los resultados a los 7 días en lugar de a los 5 días. Se cambia la referencia bibliográfica de la USP de la 35 a la 40 y se agrega el capítulo <111> de la misma.