


| | | |
|--|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 |
| | | Versión: 04 |
| | | Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 |
| | | Página 1 de 11 |

1. PROPÓSITO

Demostrar la actividad (potencia) de la Azitromicina dihidrato respecto a un estándar conocido; ésta potencia puede demostrarse por su efecto inhibidor sobre el microorganismo de prueba. El método descrito en éste procedimiento es el de difusión en agar del antibiótico, para lograr la completa inhibición del crecimiento del microorganismo añadido en un área circular llamada halo de inhibición.

Para determinar la concentración del antibiótico en un producto o materia prima, se elabora una curva de calibración sobre la base del estándar conocido y posteriormente se corre la muestra desconocida bajo las mismas condiciones, para ubicar el dato obtenido dentro de la curva elaborada. La inhibición bacteriana es directamente proporcional a la concentración del antibiótico en cuestión.

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica sobre la materia prima Azitromicina dihidrato y sobre los productos que la contienen en su formulación en las siguientes formas farmacéuticas: polvos para suspensión y comprimidos.

3. DOCUMENTOS RELACIONADOS

| CÓDIGO | NOMBRE DEL DOCUMENTO |
|------------|--|
| PEO-AC-085 | Preparación de medios de cultivo y diluyente |

4. DEFINICIONES

Unidades ó µg de Actividad: Forma en la que se designa la potencia de los antibióticos

Sustancia de Referencia (SR): es aquella sustancia empleada como parámetro de referencia (estándar).

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: 15/06/2023 |
| Revisado por: Asistente de Documentación | Firma: | Fecha: 15/06/2023 |
| Aprobado por: Jefe de Aseguramiento de Calidad | Firma: | Fecha: 15/06/2023 |

| | | |
|--|---|---|
| Laboratorios Bonin  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 Versión: 04 Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 Página 2 de 11 |
|--|---|---|

6. CONTENIDO

6.1 Materiales


- 6.1.1 Solución salina isotónica (0.90%) estéril en tubos de 5ml.
- 6.1.2 Medio antibiótico No.11
- 6.1.3 Microorganismo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341
- 6.1.4 Buffer pH 8
- 6.1.5 Producto a analizar (Azibiotic® Baby Bon 200mg/5ml, polvo para suspensión oral, Azibiotic tabletas 500mg/tableta, Azitromicina dihidrato materia prima)
- 6.1.6 Discos de papel filtro de ¼ de pulgada de diámetro en blanco
- 6.1.7 Cajas de Petri de 8.5 cm de diámetro
- 6.1.8 Cajas de Petri de 5cm de diámetro
- 6.1.9 Mechero de gas
- 6.1.10 Pinzas estériles
- 6.1.11 Guantes de látex
- 6.1.12 Tips para pipeta de 100 µl estériles
- 6.1.13 Pipeta de volumen variable 10-100 µL
- 6.1.14 Beakers de 250 ml de vidrio
- 6.1.15 Pipetas volumétricas de 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 ml
- 6.1.16 Pipetas serológicas de 25 ml estériles
- 6.1.17 Balones aforados de 10, 50, 100 y 200 ml
- 6.1.18 Mortero y pistilo de cerámica
- 6.1.19 Espátula
- 6.1.20 Espectrofotómetro UV/VIS
- 6.1.21 Vernier

6.2 Preparación de la cepa de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

La cepa a utilizar en el ensayo de valoración debe tener de 18-24 horas de incubación. Esta debe cultivarse un día antes de realizar la valoración en agar tripticosa soya plaqueado en cajas de Petri de 5 cm de diámetro.

6.3 Preparación del estándar

- 6.3.1 La preparación del estándar puede realizarse el mismo día del ensayo o con anterioridad. La duración del mismo es de catorce días en refrigeración a partir de su preparación.
- 6.3.2 Disolver una cantidad de estándar de referencia USP de Azitromicina dihidrato o de algún lote de materia prima de este antibiótico previamente estandarizado contra el estándar USP, pesado con exactitud en metanol; la concentración final de esta solución madre debe ser de 1 mg/ml. Tomar en cuenta la potencia declarada en la etiqueta del estándar, para el cálculo de la cantidad a pesar.
- 6.3.3 El día de la valoración debe prepararse a partir de esta solución madre cinco (5) diluciones que tienen las siguientes concentraciones:

| | | |
|--|---|---|
| Laboratorios Bonin  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 Versión: 04 Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 Página 3 de 11 |
|--|---|---|

S1 = 0.6 µg/ml

S2 = 0.8 µg/ml

S3 = 1 µg/ml (concentración media, igual a la concentración final de la/s muestra/s)

S4 = 1.2 µg/ml

S5 = 1.4 µg/ml

La forma de preparar éstas diluciones se encuentra indicada en el **Diagrama 1**. Estas diluciones constituyen la curva de estándares a partir de la cual se construirá una ecuación lineal con la que se calculará la concentración de la muestra. En esta serie de diluciones se utiliza buffer pH 8 por lo que debe prepararse aproximadamente 1 litro de buffer si se trabajará una sola muestra; si se trabajará más de una muestra deberán prepararse de 300 ml más de buffer por cada muestra a trabajar (ver forma de preparación en **PEO-AC-085 Preparación de medios de cultivo y diluyentes**).

6.4 Preparación de la muestra

6.4.1 Las muestras a evaluar por medio de este procedimiento pueden ser: muestras de producto terminado ó algún lote de materia prima que ingrese para la fabricación de éstos.

6.4.2 La azitromicina dihidrato es el principio activo de los siguientes productos:


- Azibiotic® polvo para suspensión oral Baby Bon, presentación original de 15 ml
- Azibiotic® polvo para suspensión oral Baby Bon, presentación muestra médica de 5 ml
- Azibiotic® tabletas 500 mg/tableta.

6.4.3 La/s muestra/s de polvo para suspensión deben reconstituírse según las instrucciones de la etiqueta con agua purificada y diluirse como se indica en el **Diagrama 2**. En el caso de muestra médica deben reconstituírse dos frascos. La concentración final de la muestra debe ser de 1 µg/ml.

6.4.4 Para evaluar tabletas del antibiótico se debe contar con una muestra de 10 tabletas que deben pesarse para obtener un promedio de estos pesos. Después de pesarlas, deben macerarse 3 tabletas completamente con la ayuda de un mortero y un pistilo; pesar en un balón aforado de 200 ml el equivalente a 1000 mg de Azitromicina (2 tabletas) utilizando como base el peso promedio de las tabletas. Proceder a hacer las diluciones a partir de este balón según se indica en el **Diagrama 3**. La concentración final de la muestra debe ser de 1 µg/ml.

6.4.5 Para el análisis de materia prima, esta debe prepararse a una concentración igual a la del estándar medio (S3 =1 µg/ml). Ver el **Diagrama 1** que indica la preparación de la curva de estándares.

NOTA 1: en la primera dilución de la muestra se utiliza metanol como diluyente; en las diluciones posteriores se utiliza buffer pH 8 para aforar.


| | | |
|---|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 |
| | | Versión: 04 |
| | | Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 |
| | | Página 4 de 11 |

6.5 Preparación del inóculo

- 6.5.1 En condiciones asépticas (enfrente de un mechero), lavar el crecimiento de la cepa incubada por 18-24 horas con 5 ml de solución salina.
- 6.5.2 Esta suspensión de la bacteria debe ajustarse de 20 a 25% de transmitancia a 580 nanómetros en espectrofotómetro UV/VIS. Utilizando solución salina como blanco.
- 6.5.3 Deben prepararse por lo menos 5 ml de esta suspensión bacteriana ajustada, que posteriormente se agregará en la capa superior (capa inoculada) de las cajas de Petri.

6.6 Preparación de las cajas de Petri con el medio de cultivo

- 6.6.1 Para este ensayo, las cajas de Petri deben prepararse conteniendo dos capas de agar Antibiótico No. 11. La primera de ellas debe ser de 10 ml y la capa superior (inoculada) debe de ser de 5 ml.
- 6.6.2 La cantidad mínima de cajas para el ensayo es de 25 distribuidas de la siguiente forma: 20 cajas para la evaluación de la curva de estándares y 5 cajas para la evaluación de cada muestra que se incluya.
- 6.6.3 Preparar 400 ml y 200 ml del agar separadamente en frascos con tapón de rosca. (ver **PEO-AC-085 Preparación de medios de cultivo y diluyentes**). Se prepara un exceso de agar por si al momento de agregar la segunda capa alguna/s caja/s quedaran con imperfecciones en la superficie que puedan afectar la difusión del antibiótico y la formación del halo de inhibición.
- 6.6.4 Preparación de la primera capa:
 - 6.6.4.1 Enfrente de un mechero agregar la primera capa de agar; el agar debe estar a una temperatura de 45° C aproximadamente. Colocar las cajas de Petri destapadas y con la ayuda de una pipeta serológica de 25 ml estéril, servir uniformemente 10 ml en cada una de las cajas. Dejar que solidifique y proceder a agregar la siguiente capa.
 - 6.6.4.2 Antes de agregar la capa superficial de 5 ml, debe agregarse el microorganismo al agar; por cada 100 ml de agar, debe agregarse 1.5 ml de suspensión de Kocuria rhizophila ATCC 9341 previamente ajustada según el numeral 5.5. Para agregar la suspensión del microorganismo, el agar debe estar a 45° C para evitar que las células de la bacteria mueran por el calor. Después de agregar el microorganismo debe agitarse el medio en forma circular, suavemente para evitar la formación de burbujas y rápidamente debe servirse esta segunda capa de 5 ml con una pipeta serológica estéril de 25 ml, de modo que esta quede completamente plana. Deben descartarse las cajas que queden con imperfecciones en la superficie o con burbujas.

| | | |
|---|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 |
| | | Versión: 04 |
| | | Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 |
| | | Página 5 de 11 |

6.6.4.3 Después de agregar la segunda capa, dejar que el agar solidifique en las cajas antes de colocarles la tapa.

6.7 Colocación de los discos de papel filtro de las muestras y estándares

6.7.1 Curva de estándares:

6.7.1.1 Rotular las cajas de Petri como se indica en el **Diagrama 4**. De esta manera se colocarán cuatro discos de papel filtro por cada caja de agar. Dos de ellos pertenecen a un nivel de concentración de estándar (S1, S2, S4 ó S5) y dos de ellos corresponden a la concentración media de la curva de estándares (S3).

6.7.1.2 Los discos de papel filtro deben colocarse en las cajas utilizando pinzas estériles.

6.7.1.3 Inmediatamente después de colocar los discos de papel filtro estos deben impregnarse con las concentraciones de los estándares correspondientes para evitar la humectación de los mismos por el agar. El volumen a agregar es de 10µl, esto se realiza con la ayuda de una pipeta de volumen variable y tips estériles descartables.

6.7.2 Muestras:

6.7.2.1 Después de completada las cajas de la curva de estándares, proceder a rotular las cajas para evaluación de las muestras como se indica en el Diagrama 4. Nuevamente se colocan 4 discos de papel filtro en cada caja: dos de ellos pertenecen al nivel medio de la curva de estándares (S3) y los otros dos pertenecen a la muestra. Realizar este procedimiento siguiendo las instrucciones de los numerales 6.7.1.2 y 6.7.1.3.

6.7.2.2 Después de completar todas las cajas, estas deben incubarse a 35-37° C por 48 horas.

6.8 Lectura de los halos de inhibición


Después del periodo de incubación, retirar las cajas de la incubadora y proceder a leer los halos de inhibición con la ayuda de un Vernier.

6.9 Cálculo de la potencia de Azitromicina dihidrato en la muestra

El cálculo de la potencia de la muestra se obtiene ingresando los datos de los halos obtenidos (en mm) en una hoja de cálculo de Excel. Lo que la hoja de cálculo hace es lo siguiente:

6.9.1 Promedia las lecturas de los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de los estándares y del estándar medio (S3) colocado con cada una de ellas.

6.9.2 Promedia las lecturas de los diámetros de los halos de inhibición de la/s muestra/s y del estándar medio colocado con ella.

| | | |
|---|---|--|
| <div>Laboratorios Bonin</div>  | <div>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</div> <div>VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA</div> <div>ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</div> | <div>Código:</div> <div>PEO-AC-086-04</div> |
| | | <div>Versión: 04</div> |
| | | <div>Vigencia: 15/06/2023</div> <div>Vencimiento: 15/06/2025</div> |
| | | <div>Página 6 de 11</div> |
| | | |

- 6.9.3 En base al promedio general de S3 obtenido con la curva de estándares corrige los valores de las lecturas de los estándares S1, S2, S4 y S5 y el valor de la lectura de la/s muestra/s.
- 6.9.4 En base al peso del estándar de referencia utilizado calcula las concentraciones de cada nivel de estándar, para luego trazar una línea recta con los valores corregidos de la curva de estándares (eje Y) y los logaritmos de las concentraciones de estos en el eje X.
- 6.9.5 A partir de la ecuación de esta recta construida y del peso o volumen de la/s muestra/s ensayada/s, calcula la concentración de esta/s; en µg/ml primero y luego los presenta en porcentaje de azitromicina contenido en la/s muestra/s.
- 6.9.6 Después de obtener el cálculo, imprimir las hojas electrónicas, para luego adjuntarlas a la hoja técnica del producto.

7. REVISIÓN DE ESTE DOCUMENTO

El presente documento deberá revisarse el 15/06/2025 o antes de su vencimiento si fuere necesario.

8. BIBLIOGRAFÍA

Farmacopea de los Estados Unidos de América 2012 (USP 35). <81> Antibióticos – Valoraciones microbiológicas.

9. ARCHIVO

El presente documento será archivado en Gestión de Calidad bajo condiciones de seguridad adecuadas, además, se emiten dos copias controladas para el área de Aseguramiento de Calidad siendo los responsables Asistente de Documentación y Jefe de Microbiología.

10. ANEXOS

| CÓDIGO | NOMBRE |
|--------|--------|
| N/A | |


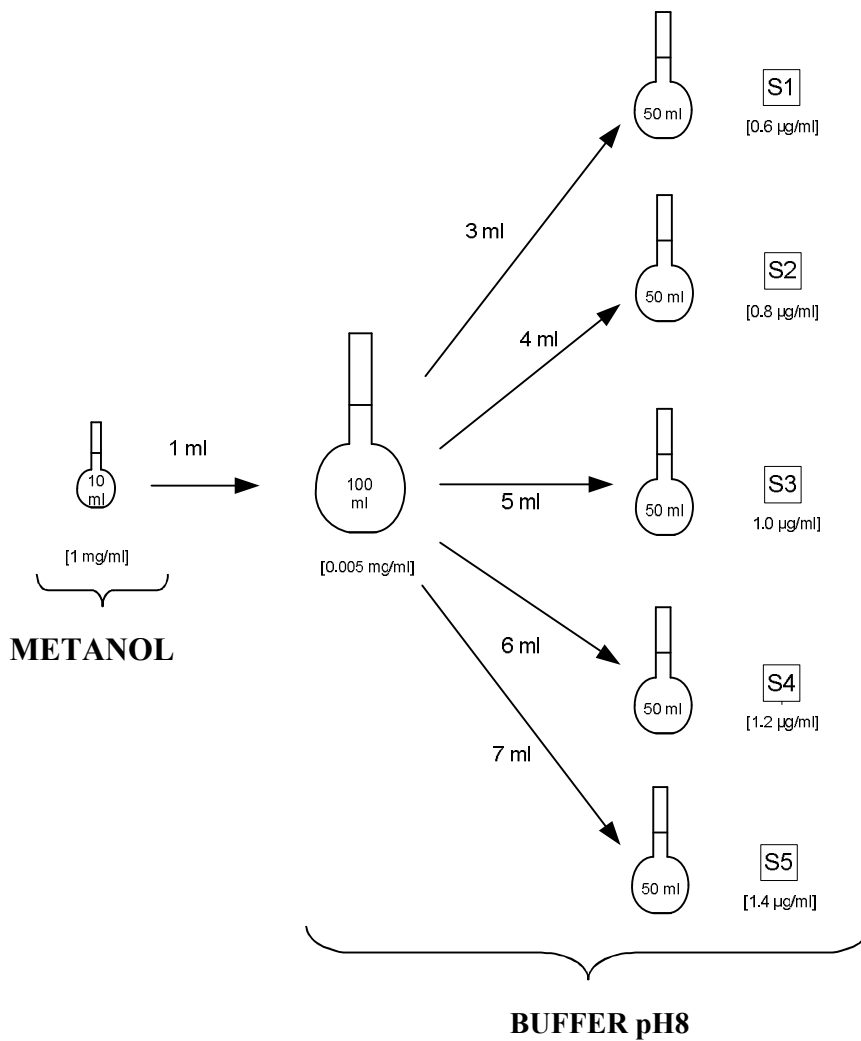
| | | |
|--|---|---|
| Laboratorios Bonin  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 |
| | | Versión: 04 |
| | | Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 |
| | | Página 7 de 11 |

Diagrama 1 - Preparación de la curva de estándares




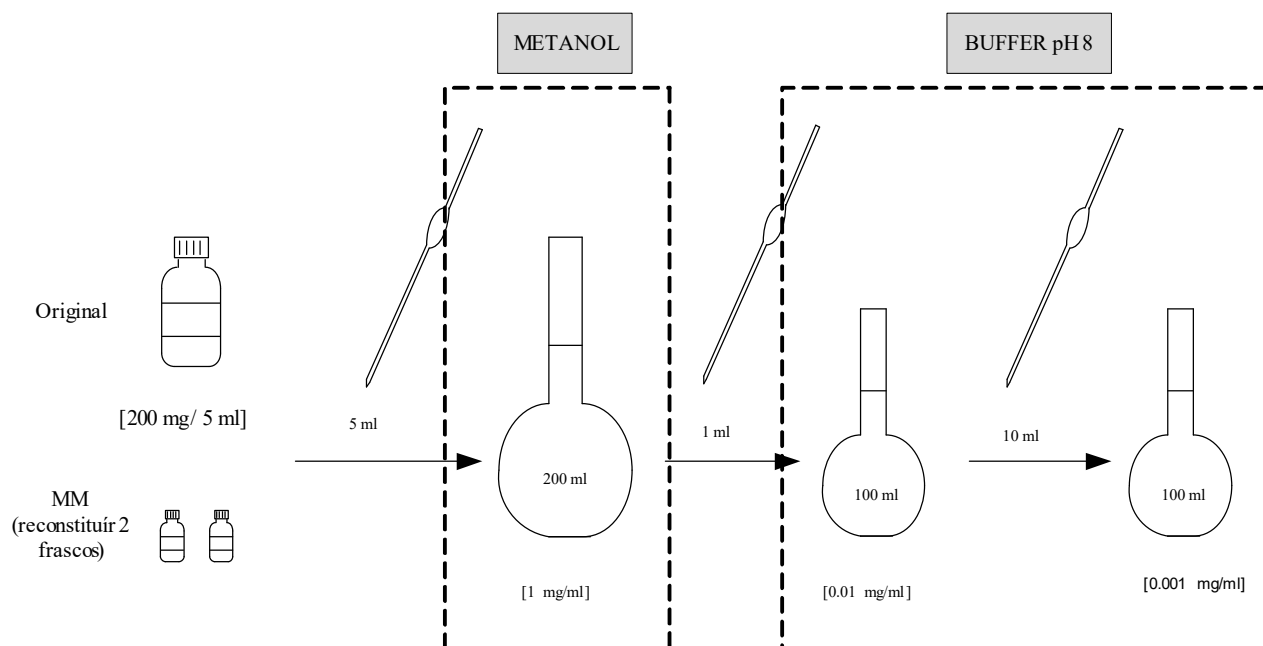
| | | |
|--|---|---|
| Laboratorios Bonin  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 Versión: 04 Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 Página 8 de 11 |
|--|---|---|

Diagrama 2 - Preparación de las diluciones de polvos para suspensión
Azibiotic® 200mg/5ml




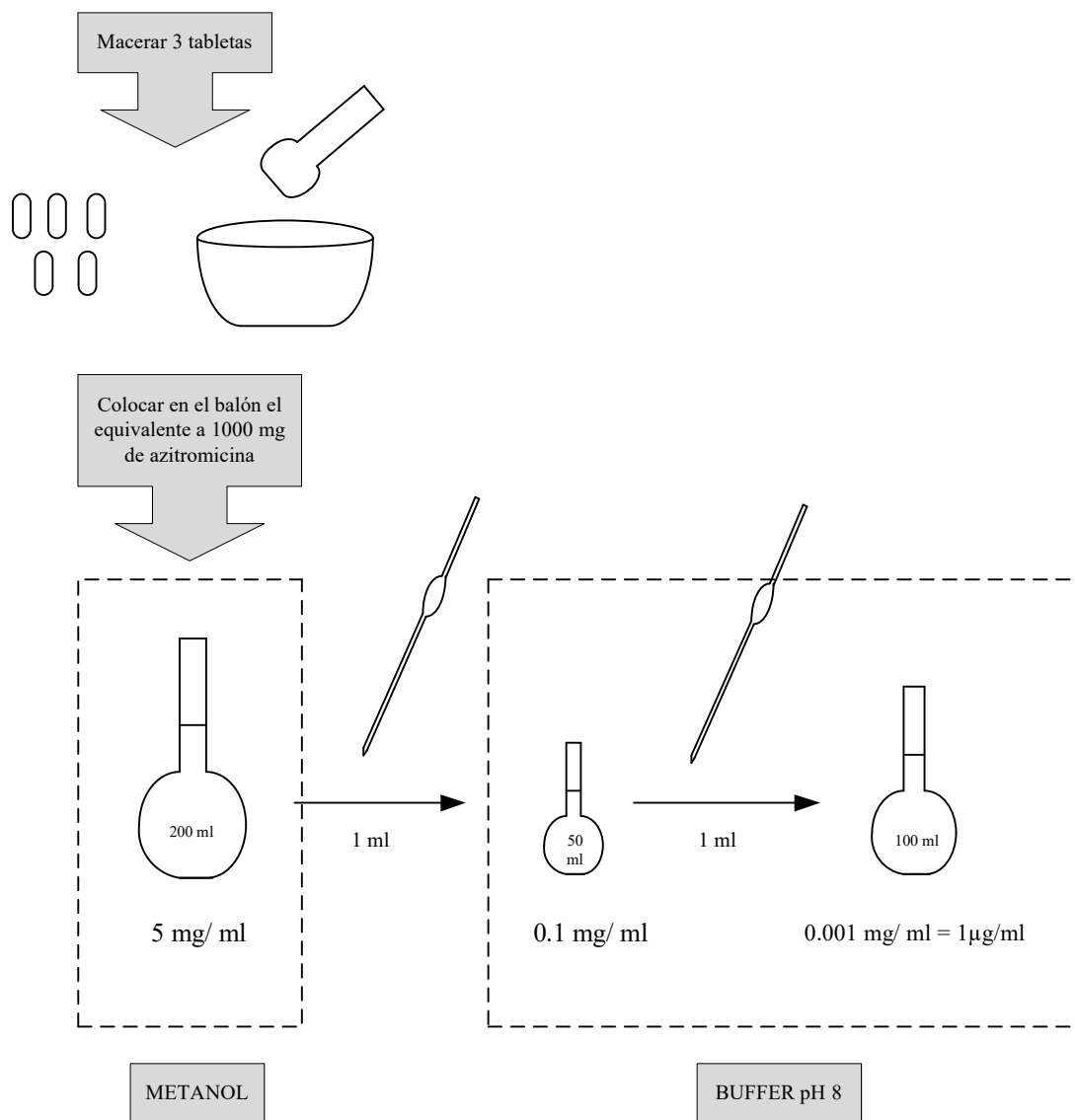
| | | |
|--|---|---|
| Laboratorios Bonin  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 |
| | | Versión: 04 |
| | | Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 |
| | | Página 9 de 11 |

Diagrama 3 - Preparación de las diluciones de tabletas
Azibiotic® tabletas 500mg/tab.




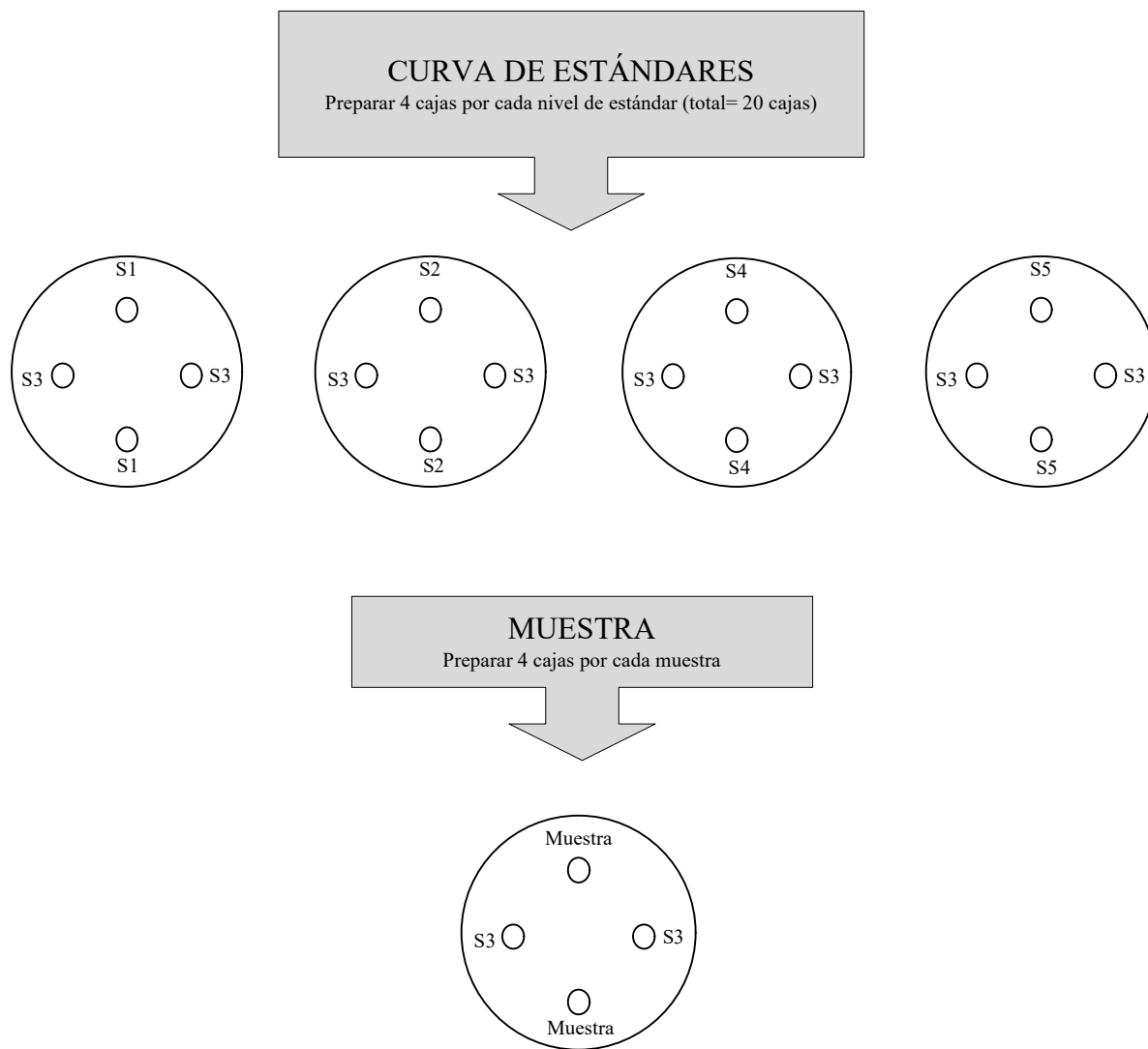

| | | |
|--|---|---|
| Laboratorios Bonin  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 |
| | | Versión: 04 |
| | | Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 |
| | | Página 10 de 11 |

Diagrama 4 - Rotulación y colocación de los discos de papel filtro en las cajas de Petri



| | | |
|--|---|---|
| Laboratorios Bonin  | PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AZITROMICINA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD | Código: PEO-AC-086-04 |
| | | Versión: 04 |
| | | Vigencia: 15/06/2023 Vencimiento: 15/06/2025 |
| | | Página 11 de 11 |

11. CONTROL DE REGISTROS

| CODIGO Y NOMBRE DEL REGISTRO | RESPONSABLE DE SU ARCHIVO | MODO DE INDIZACION Y ARCHIVO | ACCESO AUTORIZADO | TIEMPO DE CONSERVACION |
|------------------------------|---------------------------|---|---|------------------------|
| Hoja de cálculo impresa | Inspector / Analista | En Hoja Técnica de producto / Folder de análisis de materia prima | Personal del departamento de Aseguramiento de calidad | 5 años |

1. CAMBIOS EN EL DOCUMENTO

| Versión | DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO |
|---------|---|
| 1 | Se elimina el texto: “ver MA.MB.X Mantenimiento de cepas microbiológicas de referencia” del numeral 5.2 Preparación de la cepa de Kocuria rizophila ATCC 9341 Se incluye el numeral 5.4.5 que indica la forma de preparar las muestras de materia prima. En el numeral 5.5.2 se coloca un rango de transmitancia (de 20 a 25%). En el numeral 5.7.1 inciso b) se eliminan las condiciones asépticas (enfrente de mechero) se deja solamente la utilización de pinzas estériles. En el inciso c) se cambia el volumen a agregar en los discos de papel filtro de 12 a 10 µl. En el numeral 5.9.6 y en 7. Control de registros, se elimina el registro R02.PC.01 Hoja de cálculos |
| 2 | 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. |
| 3 | Cambio de versión y actualización. |